

UFRRJ

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

TESE

**Caracterização de *Aspergillus fumigatus* Isolados de
Diferentes Origens Quanto ao Perfil Enzimático,
Genético e a Produção de Gliotoxina**

Carla Alves Soleiro

2012



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E
INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**CARACTERIZAÇÃO DE *ASPERGILLUS FUMIGATUS* ISOLADOS DE
DIFERENTES ORIGENS QUANTO AO PERFIL ENZIMÁTICO,
GENÉTICO E A PRODUÇÃO DE GLIOTOXINA**

CARLA ALVES SOLEIRO

Sob a Orientação do Professor
Carlos Alberto da Rocha Rosa

e Co-orientação da Professora
Lilia Renée Cavaglieri

Tese submetida como requisito parcial
para obtenção do grau de **Doutora**, no
Programa de Pós-Graduação em
Ciência, Tecnologia e Inovação em
Agropecuária, Área de Concentração
em Patobiologia Animal

Seropédica, RJ
Dezembro, 2012

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.

579.5

S685c

Soleiro, Carla Alves, 1981-

T

Caracterização de *Aspergillus fumigatus* isolados de diferentes origens quanto ao perfil enzimático, genético e a produção de gliotoxina / Carla Alves Soleiro. – 2012.

64 f.: il.

Orientador: Carlos Alberto da Rocha Rosa.

Tese (doutorado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, 2012.

Bibliografia: f. 56-65.

1. *Aspergillus fumigatus* – Teses. 2. Micotoxinas - Teses. 3. Enzimas - Análise – Teses. I. Rosa, Carlos Alberto da Rocha, 1953-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
EM AGROPECUÁRIA**

CARLA ALVES SOLEIRO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, área de concentração em Patobiologia Animal.

TESE APROVADA EM 10/12/2012

Lilia Renée Cavaglieri. Ph.D. UNRC
(Co-orientadora)

Ana Dalcerro. Ph.D. UNRC

Kelly Moura Keller. Dra. UFMG

Douglas McIntosh. Ph.D. UFRRJ

Irene da Silva Coelho. Dra. UFRRJ

Héctor Ramón Rubinstein. Ph.D. UNC

“Uma vida não questionada não merece ser vivida.”

Platão

“A vida é assim: esquenta e esfria,
aperta e daí afrouxa,
sossega e depois desinquieta.
O que ela quer da gente é coragem.”

Guimarães Rosa

AGRADECIMENTOS

À **UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO** pela acolhida desde 2001, pela minha formação pessoal e profissional como Médica Veterinária.

Ao **PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**, em especial à coordenadora **Lucia Helena dos Anjos**, por sempre ter me dado suporte para realização dos meus estudos.

Ao **NÚCLEO DE PESQUISAS MICOLÓGICAS E MICOTOXICOLÓGICAS** por me acolherem no grupo.

Ao professor **CARLOS ALBERTO DA ROCHA ROSA** pela oportunidade e confiança no meu trabalho.

À professora **LILIA RENÉE CAVAGLIERI** pela dedicação mesmo à distância.

À professora **IRENE DA SILVA COELHO** sem a qual não seria possível a realização de uma etapa fundamental da pesquisa.

À professora **RITA CÁSSIA ALVES ALCANTARA DE MEMEZES** pela amizade e conselhos.

A **TODOS** meus amigos da Argentina e do Brasil que de alguma forma sempre me confortaram e apoiaram com palavras de carinho.

Aos **COLEGAS, PROFESSORES e FUNCIONÁRIOS** do PPGCTIA e da UFRRJ pelo carinho.

À **CAPES** pelo apoio financeiro concedido por meio de bolsa de estudos.

Ao **CNPq** e à **Agência Nacional de Promoção Científica e Tecnológica (ANPCyT)**, da Argentina, que financiaram o edital **MCT/CNPq N° 10/2008 – CNPq/ANPCyT**.

À **PESAGRO/CEPAL** por permitir a coleta e análise de amostras de alimentos.

À minha **FAMÍLIA** por me incentivarem a prosseguir e ser a **BASE** de tudo que sou hoje.

A **DEUS** pela minha vida e por permitir que tudo fosse possível.

RESUMO

SOLEIRO, Carla Alves. **Caracterização de *Aspergillus fumigatus* isolados de diferentes origens quanto ao perfil enzimático, genético e a produção de gliotoxina**. 52f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Patobiologia). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ: UFRRJ, 2012.

Algumas espécies do gênero *Aspergillus* podem causar doenças em humanos e animais como agente etiológico ou pela produção de metabólitos secundários, as micotoxinas. A contaminação por essas toxinas é um problema na produção de alimentos e no armazenamento destes. A gliotoxina possui vários papéis imunossupressivos além de poder estar envolvida no início do processo infeccioso causado por *A. fumigatus*. Na natureza, parte da atividade enzimática necessária para o aproveitamento da matéria orgânica é realizada por fungos filamentosos, e elas têm grande importância fisiológica. *Aspergillus fumigatus* é o agente etiológico mais implicado na Aspergilose Invasiva (AI) humana, no entanto a identificação dessa espécie tem sido baseada nas características morfológicas, muitas vezes de forma errônea. Ultimamente, têm sido desenvolvidos métodos de identificação de fungos toxígenos baseados em técnicas moleculares. Os objetivos desse estudo foram: avaliar a capacidade de cepas de *A. fumigatus* isoladas de diferentes origens produzirem gliotoxina; estabelecer as diferenças enzimáticas entre elas, e identificar geneticamente essas cepas, além de estabelecer possíveis influências que as diferentes origens pudessem exercer sobre essas cepas. Foram utilizadas 53 cepas identificadas morfolologicamente por *A. fumigatus* pertencentes ao Núcleo de Pesquisas Micológicas e Mitotoxicológicas, isoladas de ração para consumo animal, cereais, silagens, amostras clínicas humana e animal. Para detecção e quantificação da capacidade de produção de gliotoxina foi utilizada a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, as análises enzimáticas foram qualitativas e a caracterização genética foi realizada através da técnica *Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP). Foi utilizada a Análise em Componentes Principais expressa em gráficos Biplot. Foi possível detectar a produção de gliotoxina em todas as cepas isoladas de silagem de milho, amostras clínicas humana e animal. As cepas isoladas de amostras clínicas humanas e de silagem de milho foram as que mais produziram gliotoxina. A presença de açúcar redutor na hidrólise do amido sofreu influência do tempo, já que este foi constatado aos 14 dias em 86 % das cepas de silagem de sorgo, 100 % das amostras clínicas humana e 75 % das amostras clínicas animal. Houve uma diferença nos resultados quanto a produção de celulase, já que no papel filtro apenas uma cepa foi negativa, enquanto dez cepas produziram no agar carboximetilcelulose. Quanto a produção de caseinase, 23 % produziram essa enzima. As cepas isoladas de origem clínica (animal e humana) foram as que mais apresentaram capacidade para hidrolisar a gelatina. As cepas de origem clínica animal (isolada do úbere da vaca com mastite bovina) foram melhores caracterizadas pela variável produção de caseinase, enquanto as cepas de amostras clínicas humana e as de silagem de milho foram melhores caracterizadas pela variável produção de gliotoxina. Todas as cepas morfolologicamente identificadas como *A. fumigatus* produziram um padrão de bandas correspondente a identificação da espécie *A. fumigatus strictu sensu* pelo corte *in silico* e pela técnica de PCR-RFLP.

Palavras-chave: *Aspergillus fumigatus*. Micotoxina. Análises enzimática e molecular.

ABSTRACT

SOLEIRO, Carla Alves. **Characterization of *Aspergillus fumigatus* isolates from different sources regarding enzymatic, genetic and production of gliotoxin profiles.** 52 p. Thesis (Doctor's Degree in Science, Technology and Innovation in Agriculture, Pathobiology). Pró-reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ: UFRRJ, 2012.

The genus *Aspergillus* is a filamentous fungus found in all parts of the world, some species can cause illness in humans and animals. Contamination with mycotoxins is a problem in food production and storage. The gliotoxin has several immunosuppressive roles. Recently, it was found in conidia of *A. fumigatus*, which may indicate their involvement at the beginning of infectious disease. In nature, part of the enzymatic activity required for the utilization of organic material is performed by filamentous fungi, and they have great physiological importance. *Aspergillus fumigatus* is the etiological agent most involved in human Invasive Aspergillosis (IA), however the identification of this specie has been based on morphological characteristics. That identification can be a problem, so the development of rapid and sensitive methods for the correct identificacion of the fungi, such as the molecular techniques is relevant. The objectives of this study were: to evaluate the ability of *A. fumigatus* strains isolates from different origins to produce gliotoxin, and to establish the physiological and genetic differences of these strains and how they are influenced by different sources. A total of 53 isolates identified morphologically by *A. fumigatus*, belonging to the Nucleus of Mycological and Mycotoxicological Researchs, were isolated from: feed for animal consumption, cereal grains, corn and sorghum silages, clinicals human and animals. For detection and quantification the production of gliotoxin HPLC was used. Genetic analysis was performed by PCR-RFLP. Principal Component Analysis (PCA) was used to obtain a smaller number of variables able to express the variability of the data. It was possible to detect the production of gliotoxin in all strains of corn silage, clinical human and animal. Among the seven strains of human clinical, six produced more than 20 µg/g of the toxin. The strains isolated from corn silage and human clinical were the most produced gliotoxin. The presence of reducing sugars was influenced by time, since it was found at 14 days in 86% of strains of sorghum silage, 100% of clinical human and 75% of bovine mastitis. Only one strain of animal feed did not present conidia in the filter paper, so it was negative for cellulose hydrolysis. However, in the CMC Agar, ten strains did not hydrolyzed cellulose and 70% of these were isolated from animal feed. Almost all the strains (98%) isolated of the studied produced lipase. As for the casein hydrolysis 23% strains were positive, and those isolated from bovine mastitis were the most positive. The strains of clinical origin (animal and human) were the ones that showed highest ability to hydrolyze gelatin. According to the PCA, the clinical animal strains were better characterized by variable hydrolysis of casein, and the human clinical strains and corn silage were best characterized by the variable production of gliotoxin. All strains morphologically identified as *A. fumigatus* have produced a pattern of bands corresponding to the identification of species *A. fumigatus strictu sensu* by *in silico* cut and by PCR-RFLP technique.

Key words: *Aspergillus fumigates*. Mycotoxin. Molecular and enzymatic analysis.

RESUMEN AMPLIADO

SOLEIRO, Carla Alves. **Caracterización de *Aspergillus fumigatus* aísla a partir de fuentes diferentes sobre el perfil enzimático, genética y la producción de gliotoxina.** 52 p. Tesis (Doctorado en Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária), Pró-reitoria de Pesquisa e Pós Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2012.

1 Introducción

Aspergillus fumigatus es un hongo filamentoso involucrado en brotes nosocomiales con una alta mortalidad en pacientes inmunocomprometidos. Lo mismo también afecta las especies animales, como es frecuente en material fermentado de origen vegetal que sirve como una fuente de alimento para los bovinos. Este agente produce metabolitos secundarios y enzimas que favorecen su patogenicidad como las micotoxinas, que causan daño a salud de los seres humanos y los animales, además de ser un problema en la producción y el almacenamiento de los alimentos. Gliotoxina es una micotoxina producida por *A. fumigatus*, ha sido reportado en la aspergilosis experimental animal y la aspergilosis (IA) humana invasiva, la caracterización de estos metabolitos puede aclarar el taxonomía y la fisiología de *A. fumigatus*.

Estudios previos han intentado encontrar correlaciones entre las características fenotípicas y genotípicas de esta especie. Es importante que se consideran características fenotípicas, sin embargo, hay una serie de dificultades con respecto a este tipo de identificación, lo que limita su uso como una herramienta en la tipificación habitual de cepas clínicas y ambientales.

Así, este estudio tuvo como objetivo: evaluar la capacidad de las cepas de *A. fumigatus* procedentes de distintas fuentes en la producción de gliotoxina y para establecer las diferencias enzimáticas y genéticas de estas cepas, así como una correlación entre las variables y los diferentes orígenes.

2 Material y Métodos

Utilizamos 53 cepas de *Aspergillus fumigatus* pertenecientes al Centro de Investigación en Micológica y Mitoxicológicas, aislado de alimentos para el consumo animal, cereales, maíz y sorgo ensilado, las clínicas humanas y de los animales. Se prepararon a partir de los filtrados de cultivo de hongos de cada cepa se secaron, y se resuspendieron en la fase móvil para el análisis de la producción de gliotoxina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El aparato utilizado fue un Perkin Elmer Serie 200 equipado con inyector automático conectado a una pre-columna Nucleosil C18 y columna Phenomenex Luna C18 fase inversa, en el sistema de disolvente isocrático: 75% (ácido acético al 1% en agua) y acetonitrilo al 25%. El tiempo de retención de la gliotoxina fue de 6,10 min, la detección se realizó a 254 nm y la tasa de flujo de 2 ml min⁻¹. El límite de detección fue de 0,2 mg / g y de cuantificación de 0,5 mg / g. Todas las cepas fueron evaluadas por su capacidad en producir amilasa en 7 y 14 días, de acuerdo con la metodología utilizada por Cruz (1985). Con 14 días se observó también la producción de azúcar reductor con el reactivo de Fehling y la presencia de ácido mediante la adición de solución alcohólica de azul de bromotimol (CRUZ, 1985). Las cepas fueron probadas para la producción de lipasa por el Agar Spirit Blue suplementado con tributirina (Difco™ Spirit Blue Agar e Difco™ Lipase Reagent) (STARR, 1941).

La detección de la producción de celulasa se realizó por cultivo en el medio de cultivo Omelianski envasa en tubos de ensayo con el tornillo (no contiene fuente de carbono), complementado por una tira de papel de filtro estéril, que se introdujo en el medio después de la siembra hongo (Cruz, 1985). También se verificó en el medio Omelianski en presencia: de azúcares reductores utilizando el reactivo de Fehling, y de ácido mediante la adición de azul de bromotimol después de 21 días de incubación (CRUZ, 1985). Producción de celulasa también se detectó por carboximetilcelulosa de agar (CMC) (COURI, FARÍAS, 1995). Para analizar la producción de proteasas, todas las cepas se ensayaron para la producción de gelatinasa medio nutriente gelatina (CRUZ, 1985) y para caseinase en agar caseína (CRUZ, 1985).

Se realizó una correlación de Pearson entre las variables, los valores de $p < 0,05$ fueron considerados significativos, lo que indica una correlación entre las variables. Se utilizó el Análisis de Componentes Principales (ACP) para obtener un número más pequeño de variables y el análisis de las relaciones entre las variables.

Se seleccionaron las secuencias del gene *benA* disponibles en la base de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) de tres especies: *Aspergillus fumigatus*, *Neosartorya udagawae* e *Aspergillus lentulus* para análisis in silico de las enzimas de restricción: *BccI*, *HinfI*, *MspI* e *Sau3AI* (Promega®). La análisis de PCR-RFLP del gene *benA* se realizó mediante amplificación por PCR con cebadores β tub1 y β tub2 (STAAB et al., 2009). Los productos de PCR se cortaron con las enzimas de restricción *BccI*, *HinfI*, *MspI* e *Sau3AI* (Promega®). Los fragmentos de ADN se visualizaron en gel poliacrilamida teñidos en bromuro de etidio, y los tamaños se estimaron por comparación con el marcador GeneRuler 50 pb de ADN escalera (Fermentas®).

3 Resultados y Discusión

Producción de gliotoxina se detectó en 91% (48/53) de las cepas por cromatografía líquida de alta resolución. Análisis de Varianza (ANOVA) detectó diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre los niveles de producción de gliotoxina por cepas de *A. fumigatus* procedentes de diferentes fuentes, la prueba de la diferencia menos significativa de Fisher (least significant difference (LSD) test) demostró que las cepas aisladas a partir de ensilaje de maíz y clínico en humanos las producidas más toxina. Entre las siete cepas de origen clínico en humanos, todo fueron capaces de producir gliotoxina y los seis de estos producido más de 20 g / g. La Prueba para la presencia de azúcar reductor en el medio de cultivo para la hidrólisis de almidón se constaba que 86% de las cepas mostró este compuesto.

La producción de celulasa se probó en dos medios de cultivo diferentes, en agar Omelianski y medio carboximetilcelulosa (CMC), en el primero medio sólo una cepa aislada de alimentos para animales no produjo celulasa y en medio CMC diez cepas en agar CMC no producen celulasa. Se detectó producción de lipasa por 98% de las cepas. Caseinase producción se detectó en 21% de las cepas y las cepas aisladas de muestras clínicas animales (mastitis bovina) fueron los había más muestras positivo (3/8). *Aspergillus fumigatus* puede obtener nutrientes de la destrucción de los tejidos del huésped (WILLGER et al., 2009), esta función fue comprobada por cepas proteolíticas de origen clínica de este estudio, ya que éstos fueron los que más mostraron la capacidad de producir la gelatinasa.

El análisis de componentes principales representados en los gráficos Biplot mostró que las cepas de origen clínico humanos se caracterizan mejor por la variable de producción de gliotoxina (Gli) y la variable de producción de gelatinasa (HG) mejor caracteriza las cepas de ensilaje de sorgo. Clivajes in silico de secuencias de ADN del gen *benA* con las enzimas *BccI*, *HinfI*, *MspI* e *Sau3AI* generaron patrones de restricción diferentes las tres especies (*A. fumigatus*, *Neosartorya udagawae* e *A. lentulus*). Los fragmentos generados por PCR del gen

β tubulina fueron acerca de 500 pb. La PCR-RFLP del gen *benA* hecha por Staab et al. (2009) y este estudio distingue tres especies del género *Aspergillus* sección *Fumigati*, ya la enzima de restricción utilizada, *BccI*, generó un polimorfismo estable entre las especies, entonces esta enzima funciona como buen marcador para la discriminación de morfotipos *Aspergillus fumigatus*. Además, otros dos enzimas de restricción *MspI* y *Sau3 AI* se utilizaron, y también fueron capaces de distinguir las diferentes cepas de *Aspergillus fumigatus stricto sensu*.

Palabras-clave: *Aspergillus fumigatus*. Micotoxinas. Análisis enzimáticos y genéticos.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Patógeno Oportunista e Contaminante de Alimentos	3
2.2	Capacidade de Produção de Gliotoxina de Cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	3
2.3	Relação entre <i>Aspergillus fumigatus</i> Produtores de Gliotoxina e Aspergilose Invasiva (AI)	5
2.4	Potencial Enzimático de <i>Aspergillus fumigatus</i>	6
2.3	Relação entre <i>Aspergillus fumigatus</i> Produtores de Gliotoxina e Aspergilose Invasiva (AI)	5
2.4	Potencial Enzimático de <i>Aspergillus fumigatus</i>	6
2.4.1	Produção de amilase	7
2.4.2	Produção de celulase	8
2.4.3	Produção de lipase	8
2.4.4	Produção de proteases	9
2.5	Seção <i>Fumigati</i> e a Problemática na Identificação de suas Espécies	9
2.6	Utilidade da Combinação de Dados Fenotípicos e Genotípicos para o Estudo das Relações entre as Cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	10
2.6.1	Técnicas Genotípicas para Identificação de <i>Aspergillus fumigatus</i>	10
2.7	Aplicação de Análise Estatística Multivariada	14
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Microrganismos e Condições de Cultivo	16
3.2	Avaliação da Capacidade de Produção de Gliotoxina por <i>Aspergillus fumigatus</i>	16
3.2.1	Produção de gliotoxina	16
3.2.2	Extração, detecção e quantificação de gliotoxina produzida por <i>Aspergillus fumigatus</i> através de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)	17
3.2.3	Análise estatística	17
3.3	Detecção de Enzimas Produzidas por <i>Aspergillus fumigatus</i>	17
3.3.1	Produção de amilase	17
3.3.2	Produção de lipase	18
3.3.3	Produção de celulase	19
3.3.4	Produção de gelatinase	20
3.3.5	Produção de caseinase	21
3.4	Correlação entre as Variáveis Enzimáticas, a Produção de Gliotoxina e as Diferentes Origens de Cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	21
3.5	Caracterização Genotípica de <i>Aspergillus fumigatus</i>	22
3.5.1	Extração de DNA total das cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	22
3.5.2	Análise <i>in silico</i> de perfis de restrição	23
3.5.3	PCR-RFLP (<i>Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	23
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1	Avaliação da Capacidade de Produção de Gliotoxina pelas Cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	25

4.2	Análise Enzimática de Cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i> de Diferentes Origens	27
4.2.1	Produção de amilase	27
4.2.2	Produção de celulase	27
4.2.3	Produção de lipase	28
4.2.4	Produção de gelatinase e caseinase	29
4.3	Estudo de Correlação entre as Variáveis Enzimáticas e a Produção de Gliotoxina	32
4.3.1	Análise multivariada - Análise dos componentes principais (ACP)	32
4.4	Caracterização de Cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i> por PCR-RFLP (<i>Polimerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length’ Polymorphism</i>)	36
4.4.1	Análise <i>in silico</i> dos perfis de restrição	36
4.4.2	PCR-RFLP do gene <i>benA</i> que codifica a proteína β -tubulina de cepas de <i>Aspergillus fumigatus</i>	36
5	CONCLUSÕES	41
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Aspergillus* abrange cerca de 200 espécies, é um fungo filamentosso, cosmopolita com importância veterinária e humana. Ele está implicado em algumas doenças de plantas, animais e humanos, mas também tem uso benéfico nas indústrias farmacêutica e alimentícia.

Aspergillus fumigatus acomete principalmente pessoas imunodeprimidas, está envolvido em surtos hospitalares com alto índice de mortalidade entre os doentes. Essa espécie também acomete animais principalmente por ser prevalente em material fermentado de origem vegetal que serve de fonte de alimentos para bovinos. O fator mais determinante para que *A. fumigatus* cause doença é o estado imune do hospedeiro. Além disso, esse patógeno pode produzir metabólitos secundários e enzimas que favorecem a patogenicidade.

Micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos que são um grande problema na produção e armazenamento de alimentos. Há relatos de que esses metabólitos possam fornecer uma vantagem competitiva sobre outros microrganismos, no entanto ainda não está totalmente elucidado o papel deste metabólito. Além dos danos que essas toxinas podem causar a saúde humana e animal, há a perda econômica já que essa contaminação pode atingir cerca de 80 % das culturas em regiões tropicais.

Apesar da reconhecida toxicidade da gliotoxina, a informação que descreve a produção e a estabilidade das toxinas de *Aspergillus fumigatus* em alimentos é escassa. A gliotoxina é uma potente toxina produzida por *A. fumigatus*, apresenta em sua fórmula química uma ponte dissulfeto em um anel de piperazina essencial para sua toxicidade. Essa toxina está relacionada à imunossupressão do hospedeiro e já foi relatada em aspergilose experimental animal e Aspergilose Invasiva (AI) humana, e nesse último caso em 80 % dos pacientes. Sua produção já foi detectada em mais de 95 % de isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus*, porém ainda não se sabe os reais fatores que levam o fungo a produzi-la. A metodologia de eleição utilizada para detecção e quantificação dessa toxina é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

Fungos filamentosos são responsáveis por parte da atividade enzimática necessária para o aproveitamento da matéria orgânica, e a produção dessas enzimas pode ter relevância para sobrevivência desses fungos em diferentes nichos ecológicos. Além do uso dessas enzimas nas indústrias em geral, sua caracterização pode elucidar a taxonomia e fisiologia de *Aspergillus fumigatus*.

Estudos têm tentado encontrar correlações entre características fenotípicas e genotípicas de cepas de *A. fumigatus*, no entanto não conseguiram obter uma relação estrita entre esses dados. Epidemiologicamente, é importante que sejam consideradas características fenotípicas na identificação dessa espécie, no entanto, há uma série de dificuldades quanto a identificação fenotípica que pode limitar a utilização dessa ferramenta para a tipagem de rotina de isolados clínicos e ambientais dessa espécie.

O uso de técnicas moleculares tem o potencial de melhorar a precisão do diagnóstico de infecções fúngicas, possibilitando a escolha por antifúngico específico, assim como detecção de fungos micotoxicogênicos antes mesmo da produção da toxina. Não há estudos disponíveis que correlacionam o perfil enzimático de cepas de *A. fumigatus* isoladas de distintas origens com a capacidade de produzir gliotoxina. Assim como, estudos que identifiquem geneticamente essas cepas de *A. fumigatus*.

Assim, esse estudo teve por objetivos: avaliar a capacidade de cepas de *A. fumigatus* isoladas de alimentos destinados para animais e de origem clínica em produzir a gliotoxina; estabelecer as diferenças enzimáticas de cepas de *A. fumigatus* isoladas de diferentes origens; estabelecer uma possíveis correlações entre a produção de gliotoxina, o perfil enzimático e as distintas origens das cepas de *Aspergillus fumigatus*; e identificar mediante a técnica de PCR-RFLP todas as cepas do estudo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Patógeno Oportunista e Contaminante de Alimentos

O gênero *Aspergillus* é um fungo filamentosos encontrado em todas as partes do mundo, onde somente algumas espécies podem causar doenças em humanos e animais (HIRSH; ZEE, 2003). Nesse gênero estão incluídas cerca de 200 espécies, em que algumas têm um enorme impacto sobre a saúde pública, maleficamente como patógenos de humanos e plantas, e beneficemente em indústrias (GUGNANI, 2003). Várias espécies desse gênero são utilizadas na produção industrial de alimentos e de produtos farmacêuticos devido aos seus ricos perfis enzimáticos. *Aspergillus niger*, por exemplo, é utilizado na produção industrial de ácido cítrico, amilases, pectinases, fitases e proteases; *A. terreus* é usado na fabricação de drogas para redução do colesterol, e *A. oryzae* é usado para a fermentação de soja e arroz em molho de soja e saquê, respectivamente (DAGENAIS; KELLER, 2009).

A seção Flavi também faz parte do gênero *Aspergillus*, as espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* podem contaminar diversos tipos de alimentos e substratos e produzir aflatoxina, que é uma substância cancerígena tóxica com propriedades imunossupressivas (WILD, 2007; WILLIAMS et al., 2004). O consumo de produtos contaminados por essa toxina pode causar doenças graves ou morte, e é um problema comum de países em desenvolvimento.

Aspergillus fumigatus é a espécie que predomina em material fermentado de origem vegetal e alguns surtos de doenças em animais normalmente são oriundos dessa fonte (HIRSH; ZEE, 2003). São fungos que apresentam hifas septadas, conidióforos que são ramificações de hifas oriundas de uma borda celular presente no micélio vegetativo terminando em uma vesícula expandida. Esta é coberta por uma ou várias camadas de fiáldes, de onde emergem cadeias de conídios pigmentados que são as unidades reprodutivas assexuadas que dão coloração a colônia fúngica. Quando em tecidos, só é possível visualização do micélio, no entanto em cavidades que tem contato com o ar como vias respiratórias, podem aparecer conídios (HIRSH; ZEE, 2003).

A maioria dos indivíduos é imune e não desenvolve doenças causadas por *Aspergillus* spp. As aspergiloses variam de uma alergia até infecções generalizadas com grande agravo à saúde. A severidade da aspergilose é determinada por diversos fatores, e o mais relevante é o estado imunológico do indivíduo (HIRSH; ZEE, 2003). São fungos saprófitas com características patogênicas oportunistas, *A. fumigatus* é a espécie mais frequente nas aspergiloses humanas e animais (HIRSH; ZEE, 2003), seguido de *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger* e *A. nidulans* (MORGAN et al. 2005; DENNING, 1998). A intensidade da exposição é uma característica significativa na aspergilose animal e os surtos de abortos bovinos estão comumente relacionados a alimentos mofados, já em galinhas a doença coincide com o uso de cama extremamente contaminada. O estresse dos animais, devido ao manejo inadequado ou gestacional, deprime o sistema imune do hospedeiro que pode levar mais frequentemente a surtos de aspergilose (HIRSH; ZEE, 2003).

2.2 Capacidade de Produção de Gliotoxina de Cepas de *Aspergillus fumigatus*

A contaminação com micotoxinas, que são metabólitos secundários produzidos por fungos filamentosos, é um grande problema na produção de alimentos e no armazenamento destes. Estes metabólitos tóxicos não são de crucial importância para sustentar a vida do fungo, mas acredita-se que eles forneçam uma vantagem competitiva sobre outros microrganismos. Essa contaminação pode afetar negativamente a saúde humana e animal, além de levar a perdas econômicas, já que micotoxinas contaminam aproximadamente 25 % a

50% das culturas totais, e em regiões tropicais essa contaminação pode atingir cerca de 80% (ABDIN et al., 2010).

Ainda há metabólitos de *A. fumigatus* e de espécies relacionadas que não foram identificados. Dentre os que já foram identificados a gliotoxina, tripacidina, verruculogeno, e a fumigaclavina A estão relacionados com a formação de conídios, e, nesse sentido podem influenciar a infecção inicial dos pulmões (PARKER; JENNER, 1968; KHOUFACHE et al., 2007).

A gliotoxina é a principal e mais potente toxina produzida por *A. fumigatus* (KWON-CHUNG; SUGUI, 2009). Pertence à família das epipolítidioxopiperazinas, que se caracterizam pela presença de uma ponte dissulfeto em um anel de piperazina, essencial para sua toxicidade (GARDINER; HOWLETT, 2005). Essa toxina possui vários papéis imunossupressivos, o que inclui: inibição da fagocitose por macrófagos, inibição da proliferação das células T ativadas por mitógenos e a resposta citotóxica dessas células, além da apoptose de macrófagos (YAMADA et al., 2000; STANZANI et al., 2005). Há relatos de que essa toxina é produzida tanto em aspergilose experimental animal quanto em Aspergilose Invasiva (AI) humana, e nesse caso com concentrações séricas de 166-785 ng/mL em 80% dos pacientes. Acredita-se que devido a sua atividade biológica ela atua como um fator de virulência (RICHARD et al., 1996; LATGE, 1999; LEWIS et al., 2005). Bok et al. (2006) demonstraram que a mutação em um gene chave (*gliZ*) para via biossintética da gliotoxina, resulta no mutante (Δ *gliZ*) que quando inoculado tem diminuída a produção dessa toxina além da perda de expressão gênica de outros genes do cluster da gliotoxina.

Alguns estudos têm descrito baixa porcentagem de cepas de *Aspergillus fumigatus* produtoras de gliotoxina. No entanto, em um recente estudo foi possível detectar que mais de 95 % dos isolados clínicos e ambientais de *A. fumigatus* produziram essa toxina (KUPFAHL et al., 2008).

Os detalhes quanto aos fatores que influenciam a produção de gliotoxina por cepas de *A. fumigatus* ainda são desconhecidos, no entanto sabe-se que ela é regulada por fatores externos, como alto suprimento de oxigênio (WATANABE et al., 2004). Holl; Denning (1994) e Willger et al. (2008) estudaram o efeito de baixas tensões de oxigênio sobre o crescimento de cepas de *Aspergillus* spp., inclusive de *A. fumigatus stricto sensu*, e constataram que essas cepas são capazes de crescer em baixas tensões parciais de oxigênio (mínimo 0,1%), o que pode ter implicações tanto na patogenicidade quanto na atividade antifúngica (HOLL; DENNING, 1994). Ainda sobre a produção de gliotoxina, esta sofre influencia de acordo com a composição do meio de cultivo, como: fonte e concentração de carboidrato, e a temperatura de incubação do cultivo fúngico (BELKACEMI et al., 1999; KOSALEC; PEPELJNJAK, 2005).

Em ensaio experimental sobre a produção de gliotoxina, realizado com nove cepas de *A. fumigatus* de origem clínica em dois meios de cultivo líquidos, caldo extrato de levedura sacarose (YES) e caldo Czapek-Dox, a 25°C e 37°C, a maior produção da toxina foi obtida em caldo YES, incubado a 37°C, e altas concentrações da toxina foram obtidas depois de 3 dias da inoculação (KOSALEC et al., 2005). Enquanto, Belkacemi et al. (1999) observaram que as melhores condições para a produção dessa toxina foi em caldo Czapek-Dox suplementado com 30 % de glicose, a 37°C, e a maior concentração de gliotoxina foi obtida 29 horas depois da incubação, durante a fase exponencial de crescimento fúngico. Contudo, Frisvad (1989) considerou que a maioria dos metabólitos secundários de *A. fumigatus* são produzidos em maior quantidade a 25°C e não 37°C.

Devido a importância da gliotoxina, métodos para a detecção e quantificação desse metabólito têm sido desenvolvidos na análise de amostras de diversas origens, e recentemente em alimentos destinados a animais domésticos (PENA et al., 2010, PEREYRA et al., 2008). As metodologias usadas são baseadas em Cromatografia em Camada Delgada (CCD),

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (SANTOS et al., 2003; BOUDRA; MORGAVI, 2005; KOSALEC, 2005; LEWIS et al., 2005; PEREYRA et al., 2008) ou uma combinação de técnicas que incluam CCD, CLAE e Espectrometria de Massa (MS) ou Ressonância Magnética Nuclear (RMN) (BAUER et al., 1989; BELKACEMI et al., 1999; RAMOS et al., 2002; NIEMINEN et al., 2002).

Procedimentos baseados em CCD permitem a investigação rápida de cultivos fúngicos, porém carecem de seletividade e sensibilidade quando comparadas com os métodos baseados em CLAE. A CLAE acoplada a espectrometria de massas (CLAE MS/MS) tem sido usada para determinações quantitativas de micotoxinas e muitas delas se baseiam em métodos que permitem a determinação simultânea de várias micotoxinas (multitoxina) presentes em uma amostra (SULYOK et al., 2006), essa metodologia analítica permite a obtenção de resultados precisos e confiáveis.

2.3 Relação entre *Aspergillus fumigatus* Produtores de Gliotoxina e Aspergilose Invasiva (AI)

Devido ao aumento da incidência e gravidade de Aspergilose Invasiva (AI) humana é necessária uma melhor compreensão da interação entre o hospedeiro e *Aspergillus fumigatus* (McNEIL et al., 2001). Patogenia e virulência são termos usados quando a função imune do hospedeiro está alterada, já que este organismo é um agente patogênico oportunista, e patogenia da doença é o resultado do crescimento fúngico e da resposta do hospedeiro (DAGENAIS; KELLER, 2009). A inalação de conídios de *Aspergillus* spp. é comum, devido à sua vasta presença no ambiente, estimativas sugerem que uma pessoa pode inalar até 200 conídios por dia. Em populações susceptíveis à AI, a defesa da mucosa pulmonar está comprometida, o que facilita o crescimento e a colonização fúngica (DAGENAIS; KELLER, 2009). Em estudos de comparação genômica de isolados clínicos e ambientais a partir de distintas fontes e localizações geográficas, foi concluído que qualquer estirpe de *A. fumigatus* ambiental pode ser patogênica desde que esteja em um hospedeiro apropriado (DEBEAUPUIS et al., 1997). Além disso, o tamanho do conídio (diâmetro 2 até 3 μm) de *A. fumigatus* favorece a infiltração no alvéolo e essa espécie também suporta altas temperaturas, além de ter crescimento ótimo a 37^oC (DAGENAIS; KELLER, 2009).

A gliotoxina está envolvida no processo infeccioso de pulmões (BOK, et al., 2005; LEWIS et al., 2005; BOK, et al., 2006; CRAMER et al., 2006; COMÉRA et al., 2007). Essa toxina foi encontrada em aspergilose experimental, em pulmões de patos naturalmente infectados por *Aspergillus fumigatus*, em bovinos com aspergilose e em tecidos humanos (RICHARD et al., 1996; BAUER et al., 1989; LEWIS et al., 2005). A gliotoxina também foi detectada em tecidos infectados com *A. fumigatus* como úbere da vaca, pulmões de peru e camundongos, e soro de pacientes com AI (BAUER et al., 1989; KOSALEC et al., 2005). Os ruminantes estão muito expostos a gliotoxina, devido ao alto consumo de forragens conservadas que são comumente contaminadas prevalentemente por *A. fumigatus* (BOUDRA; MORGAVI, 2005). Essa toxina foi encontrada em pequenas quantidades em conídios de *A. fumigatus*, o que pode indicar o envolvimento da toxina no início do processo infeccioso, já que além sua produção ocorreu na germinação e também durante a conidiogênese (FISCHER et al., 2006; ABAD et al., 2010).

Os papéis da gliotoxina na patogenia da aspergilose e do principal agente etiológico da doença, *A. fumigatus*, têm sido especulado (EICHNER; MÜLLBACHER, 1984; DAGENAIS; KELLER, 2009). Cepas mutantes para produção de gliotoxina demonstraram virulência reduzida em modelos experimentais com neutropenia, no entanto em modelos não neutropênicos isso não aconteceu (DAGENAIS; KELLER, 2009). Dessa forma, concluiu-se que a patogenicidade da toxina pode estar relacionada apenas com esse tipo de hospedeiro

(DAGENAIS; KELLER, 2009). Em ensaio *in vitro* foi observado que a gliotoxina inibe a fagocitose pelos macrófagos (EICHNER et al., 1986), e também atua como indutora da apoptose de vários tipos celulares (MÜLLBACHER et al., 1988; WARING et al., 1991; SUTTON et al., 1994), podendo estar direta ou indiretamente relacionada com algumas infecções fúngicas. Em outro experimento *in vitro* foi observado que a gliotoxina contribuiu para apoptose de neutrófilos, e quando realizado experimento *in vivo* com cepa mutante para a produção dessa toxina foi observada uma redução da apoptose de neutrófilos nos sítios de infecção em hospedeiros neutropênicos, o que reduz a virulência da cepa em questão (BOK et al., 2006; SUGUI et al., 2007; SPIKES et al., 2008).

Em ensaio *in vivo* sobre Aspergilose Invasiva (AI) com rato como modelo experimental foi feita inoculação de cepas de *A. fumigatus* produtoras e não produtoras de gliotoxina a fim de investigar a capacidade dessa toxina em induzir a imunossupressão (SUTTON et al., 1996). Nesse experimento foi constatado que essa toxina atuou como agente imunossupressivo, piorando o estado imune de pacientes já imunodeprimidos, dificultou sua reabilitação e prolongou a doença (SUTTON et al., 1996). No mesmo estudo, foi demonstrado que ratos resistentes ao *A. fumigatus*, quando tratados com dose subletal de gliotoxina se tornaram suscetíveis ao fungo, assim a produção de gliotoxina por *A. fumigatus* pode exacerbar a patogenicidade do fungo primeiramente imunossuprimindo o hospedeiro e depois destruindo o tecido nos locais da infecção (SUTTON et al., 1996). No entanto, a gliotoxina não é o fator inicial para a infecção já que foi produzida *in vitro* três dias depois da inoculação de *A. fumigatus* (MÜLLBACHER et al., 1985). Em estudo de revisão foi possível concluir que a gliotoxina tem natureza ampla para imunossupressão, seja impedindo funções das células de defesa ou induzindo a apoptose dessas células (DAGENAIS; KELLER, 2009).

Em experimento *in vivo*, cepas de *A. fumigatus* com dois genes mutados, envolvidos na biossíntese de gliotoxina (Δ GLiZ e Δ GLiP), foram deficientes na produção dessa toxina (BOK et al., 2006, CRAMER et al. 2006, KUPFAHL et al., 2008, SPIKES et al., 2008; SUGUI et al., 2007), quando ratos neutropênicos foram inoculados com as cepas mutantes e comparados com aqueles inoculados com as cepas não mutantes, conclui-se que as cepas mutantes foram tão virulentas quanto as não mutantes, no entanto em testes com cultivo celular, as cepas mutantes, deficientes na produção de gliotoxina, apresentaram menor citotoxicidade (BOK et al., 2006; CRAMER et al. 2006, KUPFAHL et al., 2006).

Estudos sobre a genotoxicidade da gliotoxina demonstraram que o dano ao DNA não leva a mutação detectável em células bacterianas ou de mamíferos, mas que a mutação pode estar relacionada com a dose de gliotoxina e ao tempo de exposição à mesma (NIEMINEN et al., 2002)

2.4 Potencial Enzimático de *Aspergillus fumigatus*

Muitos trabalhos relatam o potencial e aplicabilidade das enzimas amilolíticas, celulolíticas, lipolíticas e proteolíticas nas indústrias farmacêutica, têxtil, couro, papel, mineral e alimentícia (GAMA et al., 1991; MOLINA; TOLDRA, 1992; SELVAKUMAR et al., 1996). Enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reações bioquímicas. Elas têm sido amplamente utilizadas em diversos processos industriais, desde descobertas feitas na segunda metade do século XIX (BRUHLMANN et al., 2000; MOLINA et al., 2001; GAMA et al., 2002). Na natureza grande parte da atividade enzimática necessária para o aproveitamento da matéria orgânica é realizada por fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Como a maioria das espécies das leveduras não apresenta características patogênicas, elas são amplamente utilizadas na indústria (RODRIGUES; SANT'ANNA, 2001). Indústrias de alimentos, papel e celulose, biocombustível, têxtil, farmacêutica, química fina, agroindústria e de alimentação animal e silagem vêm aplicando a tecnologia enzimática

para redução de custos operacionais, aumento da qualidade e aprimoramento dos processos diminuindo os impactos ambientais (AGBLERVOR; WEBER, 2004; SILVA et al., 2005).

As enzimas são classificadas pelos substratos com que reagem e por sua especificidade de reação, são nomeadas pela adição da terminação *ase* ao nome do substrato com o qual realizam reações (LAIDLER, 1954). De acordo com o mesmo autor, a enzima que controla a decomposição da uréia recebe o nome de urease; aquelas que controlam a hidrólise de proteínas denominam-se proteases assim como as que hidrolisam o amido são chamadas de amilases (LAIDLER, 1954). Já algumas enzimas, como as proteases tripsina e pepsina conservaram os nomes utilizados antes da adoção desta nomenclatura.

Em determinadas situações a ação dessas enzimas pode ser indesejável, como amolecimento do pepino em conserva pela ação de enzimas pécticas; ou desejável, como a presença de amilase na batata doce o que lhe confere uma melhor textura, bem como a pectinase, presente na uva e na maçã, usada pra clarificar sucos de frutas. Também há a ação das lipases que confere sabor característico nos queijos maturados do tipo Roquefort e Camembert e em diversos queijos italianos.

2.4.1 Produção de amilase

As amilases fúngicas são carboidrases e enzimas exocelulares (HARGER, 1982). Essas enzimas pertencem à classe das hidrolases que são responsáveis por reações hidrolíticas. A maioria das carboidrases é produzida por diferentes tipos de fungos e muitas espécies produzem diferentes carboidrases. Uma propriedade singular das enzimas hidrolíticas é a grande especificidade hidrolisando um substrato específico. As amilases promovem a hidrólise do amido a açúcares redutores, sendo detectadas há mais de um século em grande variedade de materiais biológicos. Essas enzimas são designadas amilolíticas porque promovem a degradação do amido, foram descritas em 1811 nos extratos de trigo; em 1831 na saliva; em 1833 no malte; em 1846 no sangue; e em 1881 produzidas pelo fungo *Aspergillus oryzae* (HARGER, 1982).

As amilases encontram aplicações nas indústrias têxteis, papel e celulose, de couro, detergentes, cervejas, bebidas destiladas, panificação, cereais para alimentação infantil, liquefação e sacarificação do amido, ração animal, indústria química e farmacêutica (BRUCHMANN, 1980; WARD, 1989; QUAGLIA, 1991; LEADLAY, 1993; WAINWRIGHT, 1995; SZAKACS, 2004; PANDEY et al.; 2005; SOCCOL et al., 2005). As enzimas amilolíticas podem ser utilizadas com o objetivo de modificar matérias-primas amiláceas e/ou obter produtos específicos, como os usos na indústria alimentícia, na modificação de farinhas utilizadas em panificação, e na fabricação de bebidas fermentadas (SPIER et al., 2004).

A detecção de açúcares redutores se dá pela propriedade de óxido-redução de cátions como cobre e prata que afeta a cor das soluções que os contêm, tornando-os adequados para emprego como componentes em reagentes analíticos. O Cu^{++} , de característica cor azul anil quando em solução alcalina, ao ser reduzido estequiometricamente a Cu^+ proporciona ao meio de reação um precipitado vermelho-tijolo; que é o fundamento químico do reagente conhecido como licor de Fehling (DEMIANTE et al., 2002). Os carboidratos capazes de reduzir sais de cobre em soluções alcalinas, conhecidos como açúcares redutores, apresentam grupamentos aldeídicos ou cetônicos livres. Assim, todos os monossacarídeos são redutores e o mecanismo de óxido-redução está relacionado com a formação de um enediol, função fortemente redutora em meio alcalino, que interconverte aldoses e cetoses. A glucose, em meio alcalino, é rapidamente transformada no enediol, levando à formação de frutose e de manose, e este composto, conhecido como redutona, ao ser oxidado à função aldônica causa a redução dos íons cúpricos (DEMIANTE et al., 2002).

O método colorimétrico para análise de açúcar redutor de Lane-Eynon se baseia no fato de que os sais cúpricos, em solução tartárica alcalina, podem ser reduzidos, quando aquecidos, por aldoses ou cetoses transformando-se em sais cuprosos vermelhos, que se precipitam, perdendo sua cor azul primitiva. O tartarato, ao unir-se ao cobre, forma um complexo solúvel, que impede a formação de hidróxido cúprico insolúvel e teria lugar se existisse cobre livre na solução alcalina. Como critério de positividade da reação verifica-se a formação de um precipitado óxido cuproso vermelho (LITWACK, 1967).

2.4.2 Produção de celulase

A celulose, dentre os materiais naturais, é o biopolímero mais abundante do mundo (BAYER; LAMED, 1992) e pode ser hidrolisada com ácidos, a glicose. A degradação microbiana da celulose é total e específica e tem estimulado o uso dos processos de fermentações celulolíticas pelo homem. Na natureza, esses processos representam a maior fonte de carbono para o solo (LYNCH et al., 1981). Existe uma grande variedade de microrganismos que produzem celulases; apenas alguns são conhecidos como verdadeiros celulolíticos, isto é, são capazes de degradar a celulose natural.

Em condições laboratoriais, algodão e papel de filtro, dentre outros, são usados como substratos indutores para a produção de exo-glicosidases e para medir a atividade do complexo celulolítico total (ROBSON; CHAMBLISS, 1989). Em análise feita para avaliar a capacidade de produção da celulase de leveduras em que o carboximetilcelulose (CMC) foi utilizado como única fonte de carbono, 39 % dos isolados foram capazes de produzir essa enzima (CRUZ et al., 2009). Em estudo realizado para análise de atividade celulolítica de alguns fungos, foram testados três fontes de carbono distintas (carboximetilcelulose, farelo de trigo e papel filtro), a maioria das espécies produziu celulase independente do tipo de fonte de carbono utilizada, mas a produção de celulase é dependente do tipo de substrato (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004). Além disso, esses mesmos autores afirmaram que fungos produtores de celulases, na natureza, não ocupam o mesmo nicho ecológico em cultura pura, já que não há competição (RUEGGER; TAUKE-TORNISIELO, 2004).

2.4.3 Produção de lipase

As lipases e as esterases constituem um importante grupo de enzimas que estão associadas ao metabolismo e à hidrólise dos lipídios. São amplamente distribuídas na natureza, sendo encontradas em organismos animais e vegetais e, também, em células de microrganismos (REED, 1975; OLIVEIRA, 2000). As enzimas lipolíticas e as celulases possuem enorme potencial para aplicações biotecnológicas (JAEGGER; EGGERT, 2002).

As lipases têm importância fisiológica, hidrolisam óleos e gorduras em ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos, essenciais aos processos metabólicos, como o transporte dos ácidos graxos e, sua oxidação e síntese de glicerídeos e fosfolipídios (REED, 1975). Além da relevância no cenário biotecnológico, econômico e industrial, já que têm sido utilizadas como ferramenta tecnológica, representa uma perspectiva de desenvolvimento nos processos para obtenção de monoglicerídios, ácidos graxos, agentes biosensioativos, compostos de aroma e sabor e lipídios estruturados ou biomodificados (OLIVEIRA, 2000).

Os fungos filamentosos são reconhecidos como os melhores produtores de lipases (CARDENAS et al., 2001b). As espécies de fungos filamentosos maiores produtoras de lipase pertencem aos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizomucor*, *Rhizopus* e *Thermomyces* (OLIVEIRA, 2000). Dentre as leveduras, *Candida rugosa* é que mais tem sido empregada em processos industriais (HADEBALL, 1991).

Sob a ótica comercial, o campo mais importante de aplicação da lipase é a adição em detergentes, devido sua capacidade em hidrolisar lipídios, com utilidade doméstica e industrial (JAEGER; REETZ, 1998; CARDENAS et al., 2001a). Outro campo de aplicação é seu uso na indústria de papel, já que remove componentes hidrofóbicos (triglicerídeos e ceras) da madeira, que causam alguns problemas durante a fabricação do papel (JAEGER; REETZ, 1998).

A atividade lipolítica pode ser detectada em placas de Petri através do emprego de um substrato lipídico incorporado ao gel de agar-agar que contenha um corante indicador (que reage com os ácidos graxos formados) ou em meio opaco que permita visualizar halo transparente de lipólise. A atividade pode ser detectada em meios de cultura onde colônias de microrganismos produtores de lipase se desenvolvem ou em gel de agar, contendo, apenas, o substrato na presença de tampão apropriado e em condições de detecção do halo (REED, 1975). Sandoval; Marty (2007) consideraram ensaios em placa de Petri sensíveis para a detecção de lipase.

2.4.4 Produção de proteases

A maioria dos estudos sobre o envolvimento de proteases em Aspergilose Invasiva (AI) tange sobre o papel das elastases do gênero *Aspergillus*, uma vez que a elastina faz parte do tecido pulmonar. Em estudo sobre a correlação da produção de elastase e a AI, feito em ratos tratados com cortisona com cepas de *A. fumigatus* produtoras e não produtoras de elastase, todos os ratos inoculados com as cepas produtoras morreram, enquanto 66 % dos tratados com cepas não produtoras sobreviveram (KOTHARY et al., 1984). Cepas de pacientes com AI apresentaram maiores atividades médias de elastase do que cepas de pacientes com aspergilomas colonizados por *A. fumigatus*, ligando a atividade da elastase à patogenicidade de doença invasiva.

Existe uma combinação de várias enzimas proteolíticas, como a caseinase e gelatinase, que pode contribuir para a capacidade do *A. fumigatus* em degradar o tecido do hospedeiro para aquisição nutricional e invasão (DAGENAIS; KELLER, 2009).

2.5 Seção *Fumigati* e a Problemática na Identificação de suas Espécies

A seção *Fumigati* inclui mais de 20 espécies de *Neosartorya* e dez *Aspergillus* spp. (HORIE et al., 2003; HONG et al., 2005, 2006, 2008). *Aspergillus fumigatus* Fresenius é um fungo filamentosos ambiental e também um importante patógeno humano (RAPER; FENNELL, 1965). Algumas espécies de *Neosartorya* têm sido descritas como agente causal de doença humana, como aspergilose invasiva, osteomielite, endocardite e ceratite micótica (CORIGLIONE et al., 1990; SUMMERBELL et al., 1992; PADHYE et al., 1994; LONIAL et al., 1997; JARV et al., 2004; BALAJEE et al., 2005, 2006). Todas as espécies de *Neosartorya* produzem ascóporos resistentes ao calor que são frequentemente encontrados em diferentes produtos alimentícios (GOMEZ et al., 1994; SAMSON, 1989; TOURNAS, 1994).

A identificação dos membros da seção *Fumigati* tem sido realizada usando as macromorfologias e micromorfologias das estruturas formadas em meios de cultivo específicos para cultura fúngica. No entanto, mesmo os estudos de Microscopia Eletrônica de Varredura que analisaram estruturalmente os ascóporos demonstraram que distintas espécies apresentaram similaridade no tamanho e superfície dessa estrutura, o que dificulta sua correta identificação. *Aspergillus fumigatus*, *A. novofumigatus*, *A. fumigatiaffinis*, *A. fumisynnematus* e *A. lentulus* mostraram fortes semelhanças morfológicas na microscopia óptica o que também dificulta uma diferenciação entre essas espécies. Além das espécies anamórficas de

Neosartorya udagawae e *N. fennelliae* também terem mostrado grande similaridade morfológica.

Em estudo taxonômico polifásico de espécies de *Aspergillus* seção *Fumigati* realizado por Samson et al. (2007), foi feita diferenciação morfológica e genética dessas espécies e também caracterização quanto ao perfil da produção de exterólitos, e dentre as 33 espécies analisadas, quatro foram capazes de produzir gliotoxina inclusive *A. fumigatus* (SAMSON et al., 2007). Por isso, foi recomendado que para uma correta identificação de espécies da seção *Fumigati* também sejam realizadas análises de sequências de DNA. Nesse mesmo estudo houve boa diferenciação e delimitação entre as espécies da seção *Fumigati* com sequenciamento dos genes que codificam a calmodulina e a β -tubulina (SAMSON et al., 2007).

2.6 Utilidade da Combinação de Dados Fenotípicos e Genotípicos para o Estudo das Relações entre as Cepas de *Aspergillus fumigatus*

Há poucos estudos acerca da caracterização fenotípica de *A. fumigatus*, dentre os que existem, esses têm reportado variações no pigmento e textura das colônias, diferentes taxas de crescimento quando incubados em distintas temperaturas, tamanho e forma dos conídios, fiálides atípicas e diferenças no tamanho e forma das vesículas (LESLIE et al., 1988; RINYU et al., 1995; SCHMIDT; WOLFF, 1997; CHANTEPERDRIX et al., 2008). Por isso, estudos têm explorado a utilidade de caracteres fenotípicos e genotípicos para a classificação taxonômica dessa espécie (LESLIE et al., 1988; Matsuda y col., 1992; RINYU et al., 1995; DEBEAUPUIS et al., 1997; RATH, 2001; KATZ et al., 2005).

Pesquisadores têm tentado encontrar correlações fenotípicas e genotípicas de cepas de *A. fumigatus*, porém não conseguiram obter uma relação estrita entre os dados comparados (RINYU et al., 1995, SCHMIDT; WOLFF, 1997). É importante considerar certas características fenotípicas já que são úteis do ponto de vista epidemiológico e podem exibir diferenças entre cepas da mesma espécie ou de diferentes espécies, além disso diferenças quanto essas características também podem ajudar na identificação de novas espécies como *A. lentulus*, que apresentava diferenças quanto ao grau esporulação e tamanho das vesículas de conídios, e baixa susceptibilidade a antifúngicos (BALAJEE et al., 2005).

2.6.1 Técnicas genotípicas para identificação de *Aspergillus fumigatus*

A identificação de fungos, ao contrário de bactérias e vírus, depende principalmente de critérios morfológicos. No entanto, a maior parte dos fungos patogênicos durante as infecções apresenta somente a fase vegetativa (ausência de esporulação) no tecido do hospedeiro, em que são observadas hifas ou outras estruturas não espécie-específicas. Por isso, é necessária a realização da cultura fúngica para visualização das macromorfologias e micromorfologias, mesmo que não sejam conclusivas para identificação. O crescimento dos isolados fúngicos em meios de cultivo apropriados permite o reconhecimento de seus traços mais característicos e é o método mais comum para identificação (GUARRO et al., 1999), porém demorado. Além disso, existe uma série de dificuldades quanto a identificação fenotípica que limita o uso dessa ferramenta para a tipagem de rotina de isolados clínicos e ambientais (LIN et al., 1995).

A análise genotípica de isolados fúngicos proporcionou um aumento na capacidade de estudar infecções causadas por esses agentes (GOTTFREDSSON et al., 1998). Os métodos moleculares eram mais usados em pesquisas, e precisavam ser padronizados e avaliados para que pudessem ser usados em laboratórios de diagnóstico de microbiologia (GOTTFREDSSON et al., 1998). O grande atrativo por essa metodologia é a rapidez e a

precisão no diagnóstico, o que pode reduzir custos com as terapias, além de torná-las mais eficientes.

As infecções fúngicas são mais comuns em pessoas imunodeprimidas, há relatos de *A. fumigatus* causando Aspergilose Invasiva em pacientes que sofreram transplante de medula óssea com alta taxa de mortalidade (WALTER et al., 1995). *Aspergillus fumigatus* é o agente etiológico mais implicado em Aspergilose Invasiva (AI) humana, no entanto a identificação dessa espécie tem sido historicamente baseada nas características morfológicas como a produção de conídios verdes e fíalides biseriadas (LATGE, 1999). Contudo, esse tipo de identificação tem sido problemática, já que alguns isolados podem produzir pouco pigmento e as condições de crescimento podem influenciar na morfologia (GUARRO et al., 1999). Várias técnicas moleculares têm sido aplicadas na identificação de *A. fumigatus* para suplementar os problemas com a identificação fenotípica (LIN et al., 1995).

O interesse por estudos moleculares de *Aspergillus fumigatus* surgiram a partir do tratamento contra a Aspergilose Invasiva (AI), já que as terapias de rotina usadas não estavam mais sendo eficazes contra a doença. Foi demonstrado que isolados identificados fenotipicamente como *A. fumigatus* eram distintos geneticamente (RINYU et al., 1995; BALAJEE et al., 2005; HONG et al., 2005; KATZ et al., 2005;).

Há uma preocupação acerca da exposição ambiental e aquisição de infecções fúngicas. O interesse pela tipagem de isolados clínicos e ambientais surgiu para que fosse possível obter: a localização das fontes ambientais de cepas que causam surtos de aspergilose, a determinação da existência de cepas patogênicas e dos seus nichos naturais; e, por conseguinte um melhoramento na estratégia preventiva contra a doença (LIN et al., 1995; GOTTFREDSSON et al., 1998).

Aspergillus lentulus e *Neosartorya udagawae* também são espécies encontradas em AI e apresentam grande similaridade morfológica com *A. fumigatus*, porém respondem de formas distintas ao tratamento com anfotericina B, itraconazol, voriconazol e caspofungina que são fármacos rotineiramente usados contra a doença. *Aspergillus lentulus* foi agente etiológico de AI e apresentou *in vitro* baixa suscetibilidade às drogas citadas anteriormente (BALAJEE et al., 2005). Em outro estudo realizado, com uso da técnica de PCR-RFLP foi possível rastrear a presença *A. lentulus* em infecção humana e também de *N. udagawae* previamente encontrado somente no solo (BALAJEE et al., 2006).

Os métodos moleculares detectam diferenças nas sequências de ácidos nucleicos dos microrganismos. A Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é uma técnica que permite a amplificação de fragmentos de DNA *in vitro*, com a utilização de duas sequências iniciadoras de nucleotídeos que hibridizam com as fitas opostas e demarcam o fragmento a ser amplificado. Ocorrem três fases durante a PCR: 1) desnaturação e abertura da fita dupla de DNA; 2) as sequências iniciadoras hibridizam com a fita-molde de DNA; 3) síntese do DNA complementar à fita-molde de DNA que é realizada pela polimerase termoestável (Taq) pela incorporação de desoxirribonucleotídeos trifosfatos (dNTP). Essas três fases se repetem por um número determinado de ciclos, que varia de acordo com o microrganismo em questão, e permite a amplificação de um segmento de DNA de fita dupla cujo término é definido pela terminação 5' do nucleotídeo iniciador onde o comprimento é a distância entre os iniciadores. Como os produtos de um ciclo de amplificação servem de molde para o próximo, cada ciclo posterior aumenta em exponencial a quantidade do produto amplificado (SCHAEFER, 2006). As metodologias fundamentadas em PCR amplificam *in vitro* sequências alvo, que é uma vantagem para o diagnóstico de microrganismos, já que podem ser identificados em amostras aquelas sem cultivo prévio (ARNHEIM; ERLICH, 1992; ABDIN et al., 2010). A PCR é realizada com iniciadores que são suficientemente homólogos para permitir a amplificação dos organismos alvos, mas que não pareiam com organismos não alvos, por isso permite a detecção específica do que se deseja.

Essa técnica apresenta alta sensibilidade sendo possível a análise com pequenas quantidades de DNA, o que também facilita o diagnóstico e também seu emprego para microrganismos não cultiváveis (GOTTFREDSSON et al., 1998). Tal método foi usado com sucesso na genotipagem de isolados clínicos de *A. fumigatus* (AUFAUVRE-BROWN et al., 1992; RATH et al., 1995). No entanto, fungos têm grande diversidade genética, e métodos moleculares baseados somente em PCR podem não ser os mais indicados para a diferenciação entre espécies muito próximas entre si (ZHAO et al., 2001).

O desenvolvimento de métodos de detecção de fungos micotoxicogênicos rápidos e sensíveis é de relevante importância, já que esses agentes contaminam alimentos destinados ao consumo humano e animal. Assim, uma alternativa é a identificação desses microrganismos por métodos moleculares antes mesmo da produção da toxina (ABDIN et al., 2010). Já foi feito um estudo que avaliou a presença de fungos produtores de aflatoxinas em diferentes tipos de alimentos com um par de iniciadores específicos para um gene regulador biossintético da aflatoxina (*aflR*) (MANONMANI et al., 2005).

O cluster gênico que codifica o RNA ribossômico (RNAr) aparece repetidas vezes no genoma fúngico, esse cluster apresenta algumas regiões altamente conservadas e outras variáveis, o que permite a análise dessa variação em diferentes níveis taxonômicos. A região 18S é mais conservada e por isso é utilizada para comparação de organismos distantemente relacionados. Já, a porção 28S é mais variável é, portanto apropriada para a comparação de diferentes gêneros ou de diferentes espécies. As regiões do Espaço Interno Transcrito (ITS) são sequências polimórficas apropriadas para discriminar espécies muito próximas entre si ou até mesmo variedades de uma mesma espécie.

Técnicas moleculares baseadas nas diferenças da região ITS têm sido usadas para o diagnóstico de fungos causadores de micose em humanos, produtores de toxinas em amostras de alimentos, bem como patógenos de plantas, sem a necessidade do isolamento prévio do fungo. Devido a grande repetição dessas sequências o diagnóstico via PCR apresenta alta sensibilidade (FUNGARO, 2000). Zhao et al. (2001) através da amplificação de genes que codificavam a região ITS identificaram *A. fumigatus* com sensibilidade de 10-100 attograma (ag) de DNA por amostra.

Uma estratégia importante que tem sido utilizada para aumentar o poder de detecção de microrganismos em amostras de alimentos, animais ou plantas é o uso da NESTED-PCR. Esta técnica é uma PCR em duas etapas, é útil quando há impurezas nas amostras que inibem a amplificação do DNA ou quando a quantidade de DNA do agente alvo é muito pequena (FUNGARO, 2000). Essa técnica permitiu Bansod et al. (2008), a partir da amplificação da região 18S do DNA, detectarem *Aspergillus fumigatus* em pacientes com tuberculose pulmonar. Também em outro estudo foi possível amplificar fragmentos das regiões ITS1 e ITS2 do gene DNA ribossomal (DNAr) através da técnica de NESTED-PCR e identificar isolados como *A. fumigatus* (ZHAO et al., 2001).

Oito isolados clínicos morfologicamente identificados como *A. fumigatus* foram testados, para determinar a utilidade da técnica de NESTED-PCR, e em menos de 12 horas pós-cultura fúngica a identificação foi obtida (ZHAO et al., 2001). No entanto, nesse estudo não foi possível diferenciar *A. fumigatus* de *N. fischeri*, nem de *A. brevipes* (ZHAO et al., 2001), o que demonstra a importância pela escolha da região a ser amplificada para que seja possível a detecção de polimorfismo entre espécies muito relacionadas entre si.

Em um estudo foram desenvolvidas 21 sondas específicas para cerca de 50 espécies fúngicas a partir da região 28S (SANDHU et al., 1995). Em outro estudo foi feito um ensaio de PCR com iniciadores e sondas específicos por espécie, desenhados através da comparação de sequências das regiões 18S do RNA ribossomal, para identificar agentes fúngicos patogênicos (EINSELE et al., 1997). Mais recentemente, foi feita caracterização de cepas de *A. fumigatus* com microsatélite baseado na técnica de PCR multiplex e foi descoberto ser

uma técnica discriminatória (ARAUJO et al., 2009), simples de executar e com excelente reprodutibilidade (VALK et al., 2008). Contudo, devido à alta sensibilidade da PCR, pode ocorrer um alto número de falso-positivo, que são pacientes com o fungo, porém sem a doença (GOTTFREDSSON et al., 1998). Com o uso da PCR competitiva é possível contornar esse problema, já que aumenta o limite de detecção da análise e identifica somente pacientes com alta carga fúngica, podendo assim correlacionar com a doença (GOTTFREDSSON et al., 1998).

Ao estudarem diferentes genótipos entre cepas de *Aspergillus fumigatus*, que respondiam de formas distintas aos grupos de antifúngicos usados contra AI, foram usados cinco pares de iniciadores distintos para a PCR (BALAJEE et al., 2005). Através desse estudo encontraram quatro genótipos distintos dentro do grupo de *A. fumigatus*, que também apresentavam diferenças fenotípicas, como maior tempo para esporulação de conídios, não crescimento a 48 °C e a concentração inibitória mínima (CIM) de crescimento com antifúngicos usados para combater IA era maior do que a CIM usada para *A. fumigatus*. Assim, Balajee et al. (2005) com o conceito filogenético identificaram uma nova espécie *Aspergillus lentulus*.

A técnica de Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD) foi descrita por Welsh; McClelland (1990) e Williams et al. (1990). A ideia geral dessa técnica é usar iniciadores curtos que se ligam e amplificam ao acaso sequências do DNA, e observar os distintos perfis genéticos gerados, principalmente, em cepas fúngicas da mesma espécie (BIRCH et al., 1995). Em 2008, foi comprovado que *Aspergillus fumigatus* isolados de infecções respiratórias apresentavam diversidade genética e também eram distintos quanto a patogenicidade/invasividade quando levado em consideração a produção de elastase (ALVAREZ-PEREZ et al., 2008). Nesse estudo a técnica utilizada foi Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso (RAPD), e os autores relataram que mesmo tendo baixa reprodutibilidade foi possível a diferenciação entre genótipos devido a boa escolha quanto aos iniciadores (ALVAREZ-PEREZ et al., 2008). Na Holanda, ocorreu um surto hospitalar de aspergilose e foi possível através de da técnica de RAPD demonstrar que as cepas clínicas de *A. fumigatus* não advinham de uma fonte comum dentro do hospital (LEEDERS et al., 1996).

Na década de 60, foi descoberto que bactérias possuem enzimas que clivam DNA de organismos estranhos protegendo as células bacterianas de microrganismos invasores. Estas enzimas, endonucleases de restrição ou enzimas de restrição, foram isoladas e purificadas para o uso em pesquisas. Cada enzima é capaz de reconhecer e clivar em uma sequência específica de DNA de fita dupla, chamada por sequência de reconhecimento ou sítio de restrição (SCHAEFER, 2006). A partir desse conhecimento foi criada a técnica Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (RFLP ou REA) que consiste no uso de enzimas de restrição para fazer a clivagem em sítios de DNA específicos com posterior comparação dos tamanhos de fragmentos gerados em gel de agarose ou poliacrilamida. E isso só ocorre devido a diferenças na sequência de DNA entre cepas gerando padrões de comprimento do fragmento de restrição diferentes (SCHAEFER, 2006).

Em clivagem de DNA total com as enzimas *XhoI* e *SalI*, foi constatada uma dificuldade devido a subjetividade na interpretação dos padrões de bandas, já que muitas delas apareceram fracas (LIN et al., 1995). Além disso, para realizar essa técnica é necessário um DNA de boa qualidade e em quantidade, além de grande quantidade da enzima de restrição. Espécies e cepas diferentes podem ter padrões de bandas distintos devido ao polimorfismo na sequência de DNA o que modifica o sítio de atuação das enzimas de restrição. A técnica de RFLP tem sido muito utilizada na epidemiologia de estudos clínicos causados por leveduras (REAGEN et al., 1990; D'ANTONIO et al., 1998; McCULLOUGH et al., 1998; VAZQUEZ et al., 1998).

Através da técnica de RFLP foi encontrado em um paciente internado na unidade de terapia intensiva diferentes genótipos de *Aspergillus fumigatus*, 48 horas após a internação, no entanto não foi possível constatar a contaminação ambiental na unidade hospitalar de internação (BIRCH et al., 1995). O perfil de DNA gerado pela técnica de RFLP pode distinguir cepas de *A. fumigatus* de diferentes origens, assim como as clínicas (BIRCH et al., 1995). Para que seja tomada medida preventiva adequada quanto a surtos hospitalares causados por *A. fumigatus*, é necessário um delineamento epidemiológico com a possível detecção de múltiplos isolados de DNA de *A. fumigatus*, assim como melhor amostragem ambiental do hospital.

Apesar do poder discriminatório da técnica de RFLP ser razoável, ela pode ser subjetiva quanto a interpretação do padrão de bandas. Pois essa técnica pode ter DNA parcialmente clivado podendo confundir o resultado. Assim, para aumentar a discriminação, ela pode ser associada com hibridização de sonda específica (GOTTFREDSSON et al., 1998). O desenho dessas sondas é baseado em áreas extremamente conservadas do genoma fúngico e na diferença entre espécies do mesmo gênero, pois são espécie-específicas (FOX et al., 1989; MITCHELL et al., 1994). O uso de sondas de hibridização também tem sido útil na identificação epidemiológica de outras espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. flavus* (McALPIN; MANNARELLI, 1995).

Quanto ao grau de discriminação entre as cepas, a técnica de RAPD comparada à técnica de RFLP, é menos demorada e adequada para rastreamento rápido de um grande número de isolados. No entanto, RAPD é uma técnica com baixa reprodutibilidade e por isso pode haver diferenças entre as análises quando realizadas em momentos e/ou lugares distintos (GOTTFREDSSON et al., 1998).

Vários estudos epidemiológicos utilizando técnicas moleculares têm demonstrado que, freqüentemente, a infecção por *Aspergillus fumigatus* em humanos ocorre como resultado da aquisição do fungo de fonte exógena (REISS et al., 1998). No entanto, estudos recentes têm demonstrado uma incorreta identificação baseada somente na morfologia de *A. fumigatus*. Balajee et al. (2006) identificaram que das 50 cepas previamente descritas como *A. fumigatus*, apenas 30 dessas eram dessa espécie segundo a técnica de PCR-RFLP. Também através dessa técnica molecular com isolados de *Aspergillus* seção *Fumigati* foi possível discriminar cepas de *A. fumigatus* (STAAB et al., 2009) daquelas muito próximas morfologicamente dessa espécie.

2.7 Aplicação de Análise Estatística Multivariada

Para estudar a relação entre duas ou mais variáveis, é possível utilizar métodos estatísticos multivariados. Em termos gerais, as análises multivariadas se referem a todos aqueles métodos estatísticos que analisam simultaneamente múltiplas medidas (mais de duas variáveis) de cada indivíduo. Os métodos estatísticos multivariados mais utilizados em estudos biotecnológicos são as distâncias genéticas, os coeficientes de similitude, dendogramas e conglomerados (MARTÍNEZ, 1995).

O agrupamento de objetos multivariados é frequentemente utilizado como método exploratório de dados a fim de obter maior conhecimento sobre a estrutura das observações e/ou variáveis do estudo. Quando se dispõe de numerosas variáveis para realizar o agrupamento, é comum utilizar (antes das análises de conglomerados) técnicas de redução de dimensão, tal como Análise de Componentes Principais (ACP), para obter um número menor de variáveis capazes de expressar a variabilidade dos dados.

A ACP é uma técnica estatística que sintetiza a informação, ou seja, constroi novas variáveis que é resultado da combinação linear das variáveis originais, reduzindo assim seu número e analisando-as como componentes para a explicação de um todo (SANTOS, 2002).

Com a ACP é construído eixos artificiais (componentes principais) que permitem obter gráficos de dispersão de observações e/ou variáveis com propriedades ótimas para a interpretação da variabilidade e co-variabilidade subjacente.

Os gráficos mais utilizados na Análise de Componentes Principais são os Biplot, propostos por Gabriel (1971), que mostram as observações e variáveis no mesmo gráfico, então, é possível fazer interpretações sobre as relações conjuntas entre observações e variáveis (INFOSTAT, 2008).

A Análise de Conglomerados é uma técnica multivariada que se utiliza para agrupar observações variáveis ou entidades de um conjunto de dados baseadas nas suas semelhanças ou diferenças. Esta tem como finalidade colocar os objetos em grupos ou clusters como sugerem os dados, “a priori” não definida, de modo que os objetos de um determinado grupo tendem a ser semelhantes em alguns aspetos e objetos em diferentes grupos tendem a diferentes (SANTOS, 2002).

Outra opção para a análise de um conjunto numeroso de variáveis é a Análise de Correlações Canônicas (ACC) (HOTELLING, 1936), que considera variáveis dependentes e independentes para determinar uma relação linear entre dois grupos de variáveis métricas. A ACC fornece uma medida da correlação entre uma combinação linear das variáveis de um grupo, com uma combinação linear das variáveis no outro conjunto.

Rinyu et al. (1995) compararam cepas de *A. fumigatus* obtidas de coleções de diferentes países quanto às suas características morfológicas, perfil de isoenzimas e polimorfismo de DNA utilizando métodos de análise multivariada. Os resultados indicaram que as cepas exibiram grande variabilidade de morfologia de colônias e taxa de crescimento em temperaturas diferentes, porém apresentaram semelhanças quanto a micromorfologia (RINYU et al., 1995). A técnica de polimorfismo de DNA ao acaso (RAPD) foi mais eficiente que a técnica obtida pelo perfil de isoenzimas para a caracterização de cepas de *A. fumigatus* (RINYU et al., 1995). De acordo com os dendogramas obtidos pela técnica de RAPD e o perfil de isoenzimas houve uma boa correlação, porém não se correlacionaram com a patogenicidade, a produção de pigmentos nem a origem geográfica das cepas (RINYU et al., 1995).

Outros estudos que aplicaram a estatística multivariada permitiram a caracterização fenotípica de cepas de diferentes origens, além da proposta de serem ferramentas promissoras para a compreensão adequada do significado funcional e ecológico da presença de diferentes cepas de um microorganismo em ecossistemas microbianos naturais. Gatti et al. (1999) aplicaram a análise de componentes principais (ACP) para discriminação entre dois grupos de espécies de *Lactobacillus helveticus* utilizados como cultivos iniciadores para a produção de queijos, e demonstraram a eficácia da ACP para distinguir cepas iniciadoras de diferentes origens através de características fenotípicas relacionadas com componentes protéicos da parede celular (GATTI et al., 1999).

Recentemente, Frías de León et al. (2011) realizaram estudos epidemiológicos com cepas de *Aspergillus fumigatus* de origem clínica humana de diferentes países da América Latina. Esses pesquisadores observaram que as cepas apresentaram diversidade fenotípica e genotípica, e consideraram de grande importância para a eficácia no diagnóstico e tratamento das doenças causadas por esse fungo (FRÍAS DE LEÓN et al., 2011). Nesse estudo, foram relacionadas: a variabilidade fenotípica, a origem geográfica e características genotípicas, e as cepas originárias do Peru mostraram características fenotípicas que permitiram separá-las claramente das demais (FRÍAS DE LEÓN et al., 2011). A associação entre as características fenotípicas e genotípicas foi significativa como demonstrado pela aplicação da análise multivariada (FRÍAS DE LEÓN et al., 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Microrganismos e Condições de Cultivo

Foram utilizadas 53 cepas (Tabela 1) identificadas morfológicamente como *Aspergillus fumigatus* pertencentes ao Núcleo de Pesquisas Micológicas e Mitoxicológicas (NPMM). A coleção micológica do NPMM de *A. fumigatus* foi obtida através da inoculação de três discos de cultura contendo micélio de uma colônia crescida em Agar Extrato de Malte (MEA). Esses discos foram colocados em microtubos de 2,0 mL com Agar água 0,2 % e armazenados a -20 °C. Para a realização dos estudos enzimático e genotípico, essas cepas foram ativadas pela inoculação em tubos com MEA por 7 dias a 30 °C.

Tabela 1: Cepas de *Aspergillus fumigatus* isoladas por origem

Origem		Cepas do NPMM	Número de cepas	
I	Alimento para consumo animal	Ração para aves	13	
		Ração para suínos		
		Concentrado farelado para bovino		
		Polpa cítrica para bovino		
		Farelo de trigo para bovino		
II	Cereais	Cevada, malte, radícula	13	
		Arroz		
III	Silagem milho	AF94, AF108, AF123, AF124, AF131	5	
IV	Silagem sorgo	AF104, AF105, AF120, AF133, AF50/06, AF50/21, AF50/27	7	
V	Clínica humana	AF113, AF114, AF115, AF116, AF117, AF118, AF119	7	
VI	Clínica animal	Mastite bovina	AF87, AF88, AF89, AF90, AF91, AF92, AF93, AF122	8

3.2 Avaliação da Capacidade de Produção de Gliotoxina por *Aspergillus fumigatus*

3.2.1 Produção de gliotoxina

Após a ativação das cepas, essas foram mantidas a 4 °C até a pesquisa para a capacidade de produção de gliotoxina. De cada cepa crescida em MEA (7 dias, 30 °C), foram retirados discos de agar contendo micélio (\pm 5,0 mm de diâmetro) e inoculados em frascos Erlenmeyer (de 250 mL) com 100 mL de meio líquido Sacarose Extrato de Levedura (YES), incubados por 2 dias, a 37 °C, a 1400 rotações por minuto (rpm).

3.2.2 Extração, detecção e quantificação de gliotoxina produzida por *Aspergillus fumigatus* através de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)

As culturas crescidas em YES foram filtradas em papel filtro Whatman N° 1. O filtrado foi extraído em agitação por 10 min com 50 mL de clorofórmio, as frações de clorofórmio foram combinadas e evaporadas até a secura em um rotaevaporador. Os extratos secos foram armazenados a - 20 °C, e posteriormente ressuspensos em 200 µL da fase móvel para análise de gliotoxina por CLAE.

O aparelho de CLAE utilizado foi um Perkin Elmer série 200 equipado com amostrador automático conectado a uma pré-coluna Nucleosil C18 e coluna Phenomenex Luna C18 fase reversa (150 x 4.6 mm, 5 µm, Phenomenex Inc., Torrance, CA, USA), usando um sistema isocrático de solventes: 75% (1% ácido acético em água) e 25% acetonitrila. A coluna foi lavada durante 5 minutos com 95% de acetonitrila, seguido por 5 min de estabilização nas condições da corrida citadas anteriormente. O tempo de retenção da gliotoxina foi de 6,10 min, a detecção foi feita em 254 nm e em fluxo de 2 mL/min. Os limites de detecção foi de 0,2 µg/g e o de quantificação foi de 0,5 µg/g.

3.2.3 Análise Estatística

Foi feita comparação das médias de produção de gliotoxina de acordo com as distintas origens através da Análise de Variância (ANOVA). Foi realizado o Teste de Diferença Mínima Significativa (DMS ou LSD) de Fischer ao nível de significância $\alpha = 0.05$.

3.3 Detecção de Enzimas Produzidas por *Aspergillus fumigatus*

3.3.1 Produção de amilase

As cepas foram avaliadas quanto à sua capacidade em produzir amilase, através da inoculação de amido solúvel no meio de cultivo em tubo de ensaio. A incubação foi efetuada a 30 °C durante sete e 14 dias. Para a determinação da atividade amilolítica foi utilizado solução de lugol em meio líquido. Após a adição de lugol se a coloração formada fosse azul indicava que não houve hidrólise, e quando ficava incolor indicava que a hidrólise foi total (CRUZ, 1985).

Aos 14 dias também foi verificada a produção de açúcar redutor através do reativo de Fehling e a produção de ácidos foi observada pela adição de solução alcoólica a 1,6% de azul de bromotimol. Foi retirada uma alíquota do meio enriquecido com amido e colocada em um tubo de ensaio para adição das soluções A e B do reativo de Fehling, o tubo de ensaio com essa mistura foi aquecido. Quando havia formação de um precipitado vermelho tijolo, a amostra era positiva para presença de açúcar redutor, e se fosse negativa o líquido permanecia azul que é a cor do reativo de Fehling (Figura 1). Foi retirada uma alíquota do meio enriquecido com amido e colocada em um tubo de ensaio para adição de gotas de 1,6% de azul de bromotimol. Quando havia formação de uma coloração amarela indicava um pH abaixo de 6,0, a cepa era positiva para presença de ácido. Cada teste foi realizado em um tubo de ensaio diferente (CRUZ, 1985) (Figura 1).

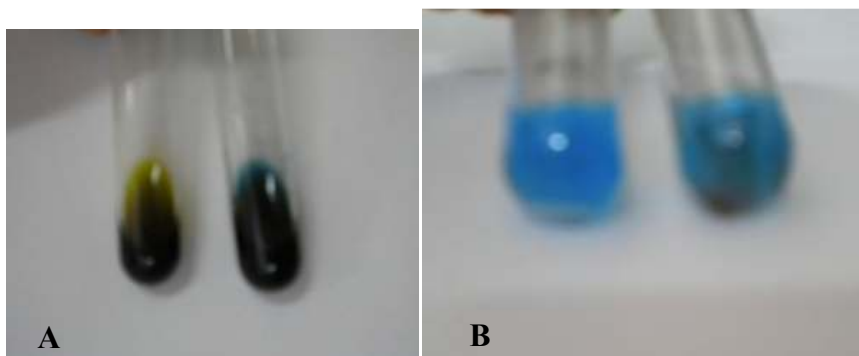


Figura 1: Presença de ácido: Na imagem A, presença de ácido pela cor amarela formada no meio, após a adição do azul de bromotímol. Na imagem B: presença de açúcar redutor, formação de um precipitado vermelho tijolo formado na presença de açúcar redutor depois da adição do reativo de Fehling e aquecimento do tubo.

3.3.2 Produção de lipase

As cepas foram testadas quanto a capacidade em produzir lipase pelo método colorimétrico no Agar Spirit Blue enriquecido com tributirina, que é um triglicerídio, fonte de lipídio do meio (Difco™ Spirit Blue Agar e Difco™ Lipase Reagent) (STARR, 1941). A produção de lipase foi aferida de duas formas: através da mudança da cor do meio, já que meio Spirit Blue era azul e se tornava transparente se a cepa produzisse lipase; e pela formação de um halo translúcido ao redor da colônia que foi medido com régua (Figuras 2 e 3). A incubação foi feita a 30 °C e a medição do halo foram realizadas após cinco dias da inoculação. Spirit Blue é o corante presente no meio, quando havia hidrólise de lipídio o meio que era azul se tornava incolor pela alteração do pH.



Figura 2: Produção de lipase. Agar Spirit Blue. A placa A, é o controle negativo, não foi inoculado. A placa B foi inoculada com uma cepa de *Aspergillus fumigatus* e foi positiva para produção de lipase, pois o meio está incolor.

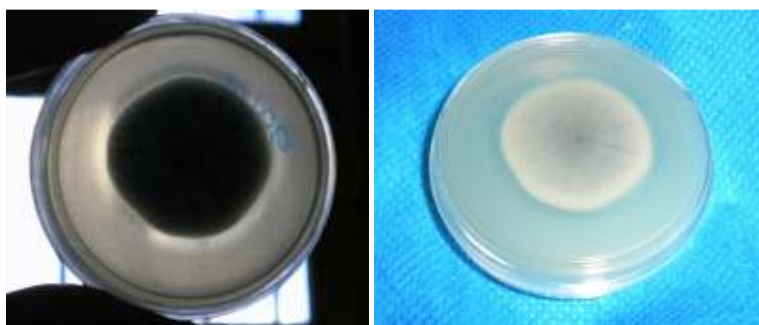


Figura 3: Agar Spirit Blue. Produção de lipase. Formação de halo translúcido ao redor da colônia nas duas placas inoculadas com cepas de *Aspergillus fumigatus*.

3.3.3 Produção de celulase

A verificação da produção de celulase foi feita através da inoculação das cepas no meio de cultura Omelianski acondicionado em tubos de ensaio com rosca (isento de fonte de carbono), suplementado por uma tira de papel de filtro estéril, introduzida no meio após a inoculação. Os tubos, incubados a 30 °C, foram observados semanalmente durante um período de três semanas (21 dias), a leitura foi realizada com 7, 14 e 21 dias. A produção da celulase foi considerada positiva quando houve degradação da tira de papel e/ou observação de conídios na fita, já que nesse teste a única fonte de carbono era o papel filtro (CRUZ, 1985) (Figura 4).

Após 21 dias de incubação, o reativo de Fehling foi utilizado para aferição da presença de açúcares redutores e foi utilizado o azul de bromotimol para verificar a presença de ácido (CRUZ, 1985). Uma alíquota do meio Omelianski foi retirada e colocada em um tubo de ensaio para adição das soluções A e B do reativo de Fehling, o tubo de ensaio com essa mistura foi aquecido. Se houvesse formação de um precipitado vermelho tijolo, a amostra era positiva para presença de açúcar redutor, e quando negativa o líquido permanecia azul que era a cor do reativo de Fehling. Também foi retirada uma alíquota do meio Omelianski e colocada em um tubo de ensaio para adição de gotas de 1,6 % de azul de bromotimol, quando havia uma coloração amarela indica pH abaixo de 6,0, que significava presença de ácido (Figura 1).

Também para verificação da produção de celulase foi utilizado o Agar Carboximetilcelulose (CMC) (COURI; FARIAS, 1995) com uma única fonte de carbono o carboximetilcelulose. Cada cepa foi inoculada em duplicata em placa com Agar CMC e após 5 dias de incubação a 30°C, foi verificada a presença de um halo translúcido ao redor da colônia após aplicação de vermelho congo 0,1 % e lavagem com solução salina (COURI; FARIAS, 1995). Quando havia a formação do halo, ele era medido com régua e a produção de celulase era considerada positiva (Figura 5).

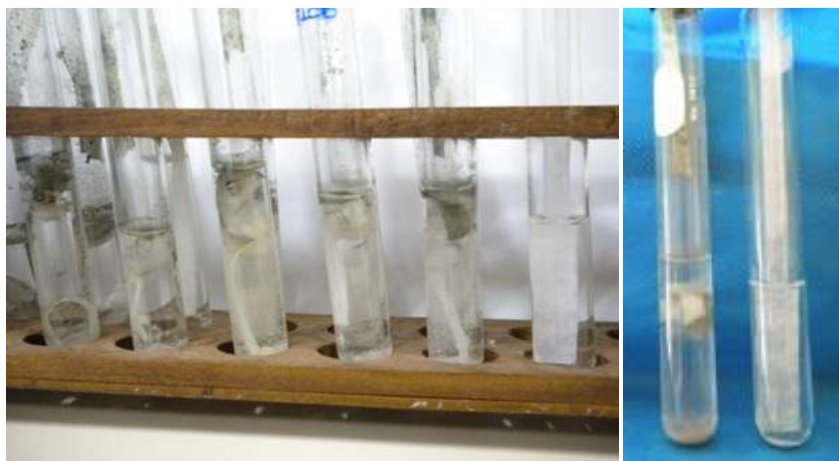


Figura 4: Meio líquido Omelianski com papel filtro para verificação da produção de celulase. Na imagem A, formação de conídios no papel filtro sendo essas cepas produtoras de celulase, no último tubo não há conídios na fita, não foi inoculado com cepa de *Aspergillus fumigatus* (controle negativo). Na imagem B, no primeiro tubo houve rompimento do papel filtro, cepa positiva para produção de celulase, o segundo tubo é o controle negativo.

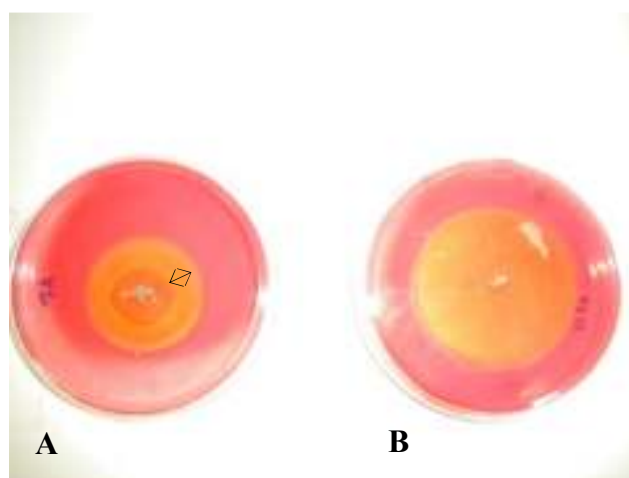


Figura 5: Placas com Agar CMC coradas com vermelho congo, produção de celulase. Imagem A: placa inoculada com cepa de *Aspergillus fumigatus* produtora de celulase, formação de halo amarelo ao redor da colônia. Imagem B: placa inoculada com cepa de *Aspergillus fumigatus* produtora de celulase, formação de halo amarelado ao redor da colônia, porém menor que na placa da imagem A.

3.3.4 Produção de gelatinase

As cepas foram analisadas quanto a capacidade em produzir gelatinase através do meio gelatina nutriente esterilizado por tindalização. Foi realizada inoculação do fungo com agulha de platina na profundidade de 5,0 cm, e os resultados eram observados após incubação (30°C) por sete e 14 dias. A cepa foi considerada positiva para produção de gelatinase após

sete e 14 dias, quando ao verter o tubo parte do meio de cultura estivesse liquefeita (CRUZ, 1985), após incubação por uma hora (4 °C).

3.3.5 Produção de caseinase

As cepas foram analisadas quanto a sua capacidade em produzir caseinase através do Agar leite, que continha na sua composição leite em pó desnatado. As placas foram inoculadas e incubadas (30 °C) por cinco dias com medição de halo translúcido formado ao redor da colônia fúngica quando a cepa era produtora de caseinase (CRUZ, 1985) (Figura 6).

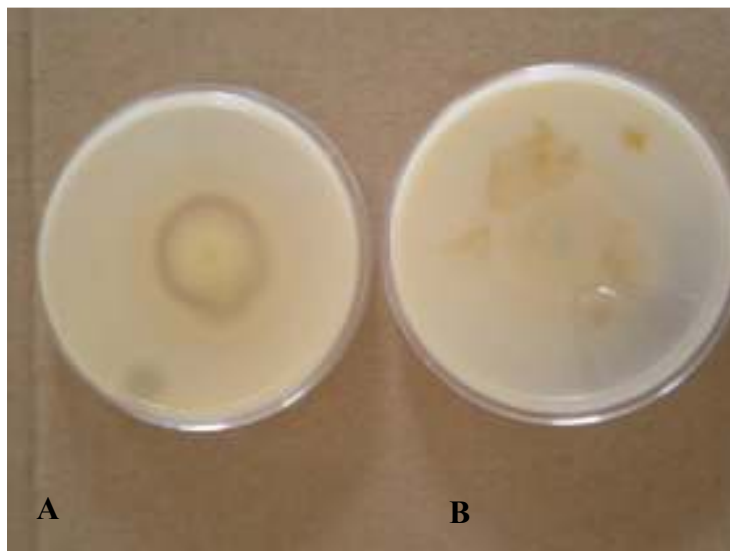


Figura 6: Placas de Petri com Agar leite. Imagem A: placa inoculada com cepa de *Aspergillus fumigatus* produtora de caseinase, formação de halo translúcido ao redor da colônia. Imagem B: placa inoculada com cepa de *Aspergillus fumigatus* não produtora de caseinase.

3.4 Correlação entre Variáveis Enzimáticas, Produção de Gliotoxina e Diferentes Origens das Cepas de *Aspergillus fumigatus*

Foi realizada análise multivariada descritiva, uma vez que as dezessete variáveis avaliadas podem ou não se correlacionar entre si e com as distintas origens das cepas. A Análise de Componentes Principais (ACP) foi utilizada para obtenção de um número menor de variáveis. Primeiramente, foi realizada a Correlação de Pearson entre as variáveis em que os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos, indicando uma correlação entre as variáveis. Assim, as variáveis que se correlacionam se comportam de maneira semelhante no estudo e por isso podem ser excluídas de estudos posteriores (ACP), obtendo-se menor dimensão de variáveis (Tabela 2).

Tabela 2: Variáveis qualitativas com suas respectivas siglas e significados

Variáveis	Siglas	Interpretação	Modalidades
Produção Amilse	HAs	com 7 dias	+ ou -
	HAq	com 14 dias	+ ou -
	AArs	presença de açúcar redutor, 7dias	+ ou -
	AArq	presença de açúcar redutor, 14 dias	+ ou -
	AAAs	Presença de ácido, 7 dias	+ ou -
	AAq	Presença de ácido, 14 dias	+ ou -
Produção Gelatinase	HGs	Com 7 dias	+ ou -
	HGq	Com 14 dias	+ ou -
	HCs	Com 7 dias	+ ou -
	HCq	Com 14 dias	+ ou -
Produção Celulase	HCv	Com 21 dias	+ ou -
	CAr	Presença de açúcar redutor	+ ou -
	CA	Presença de ácido	+ ou -
	VG	Vermelho congo, formação de halo	+ ou -
	HPH	Com 5 dias, formação de halo	+ ou -
Produção Caseinase	HCAS	Com 5 dias, formação de halo	+ ou -
Produção de gliotoxina	Gli		+ ou não detectável

3.5 Caracterização Genotípica de *Aspergillus fumigatus*

3.5.1 Extração de DNA total das cepas de *Aspergillus fumigatus*

a) Produção de biomassa fúngica

Para a obtenção de micélio, esporos de cada cepa de *A. fumigatus* foram inoculados em 50 mL de Caldo Wickerman estéril em Erlenmeyer com capacidade para 120 mL e incubado (30 °C) por três dias a 150 rpm (rotações por minuto). O micélio formado foi filtrado em filtro de papel, lavado com água destilada estéril, seco com papel absorvente e armazenado em papel alumínio a -20 °C. O tempo entre o armazenamento dos micélios e a extração de DNA foi até sete dias do congelamento.

b) Extração de DNA total

Para extração do DNA total, 200 a 300 mg de micélio fúngico foram transferidos para microtubos de 2,0 mL contendo 200 mg de pérolas de vidro (425 a 600 µm de diâmetro, Sigma-Aldrich®), 600 µL do tampão de extração (TrisHCl 100 mM pH 8,0; EDTA 20 mM pH 8,0; NaCl 1,4 M) acrescido de 50 µg/mL de proteinase K (Sigma-Aldrich®) e 7 µL de β-mercaptoetanol. Estes foram agitados em vortex por três minutos e incubados em banho-Maria (50 °C) por 30 min. Foi adicionado brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) para concentração final fosse 2 %, seguido de incubação (65 °C) por 30 min. Após este período, os microtubos foram centrifugados a 12396 g por 10 min, e o sobrenadante foi transferido para um novo microtubo. Para desproteinização, o mesmo volume de fenol:clorofórmio (1:1) foi adicionado, seguido de uma homogeneização por 2 min e centrifugação a 12396 g por 10 min. A fase superior foi transferida para um novo microtubo e foi adicionado o mesmo

volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), seguido de uma homogeneização por 2 min e centrifugação a 12396 g por 10 min. Para precipitação, a fase superior foi transferida para um novo microtubo, e foi adicionado acetato de amônio para que a concentração final fosse de 2,5 M e o mesmo volume de isopropanol gelado, seguido de incubação (20 °C) por 2 h. Posteriormente, os microtubos foram centrifugados (12396 g por 30 min), o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado com etanol 70 %. Depois de seco a temperatura ambiente em uma capela de exaustão, os sedimentos foram ressuspensos em 50 µL de água ultrapura e armazenados a -20 °C.

Para quantificação do DNA total, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com brometo de etídio (0,5 µg/mL). Após a corrida, o gel foi visualizado sob transluminador UV e as imagens foram digitalizadas em um sistema de foto documentação (Gel Doc™ EQ BIO-RAD Laboratories®). A estimativa da concentração de DNA foi feita por comparação com o padrão de intensidade de banda do marcador Lambda (λ) (Promega®), nas concentrações de 25 e 50 ng e a qualidade determinada pela ausência de rastro ao longo do gel.

3.5.2 Análise *in silico* de perfis de restrição

Sequências do gene *benA*, que codifica a proteína β-tubulina, disponíveis no Banco de Dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information) de três espécies *Aspergillus fumigatus*, *Neosartorya udagawae* e *Aspergillus lentulus* foram selecionadas para análise *in silico* da clivagem com as enzimas de restrição: *BccI*, *MspI*, *HinfI* e *Sau3AI* devido a grande semelhança morfológica. Os sítios de reconhecimento e clivagem de cada enzima de restrição utilizada foram descritos na Tabela 3.

Tabela 3: Sítios de reconhecimento e clivagem de cada enzima de restrição

Enzima de restrição	Sítio de reconhecimento de corte
<i>BccI</i>	5'-CCATC(N) ₄ ▼-3' 3'-GGTAG(N) ₄ ▼-5'
<i>HinfI</i>	5'-G▼ANTC-3' 3'-CTNA▲G-5'
<i>MspI</i>	5'-C▼CG G-3' 3'-G GC▲C-5'
<i>Sau3 AI</i>	5'-▼GATC-3' 3'-CTAG▲-5'

3.5.3 PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*)

O gene *benA*, que codifica uma β-tubulina foi amplificado utilizando os primers βtub1 (5'-AATTGGTGCCGCTTCTGG-3') e βtub2 (5'-AGTTGTCTGGGACGGAATAG-3') (STAAB et al., 2009). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25 µL, contendo tampão da Taq DNA polimerase 1X, 2,0 mM de MgCl₂; 0,2 mM de cada dNTP, 0,4 mM de cada primer, 1 U de Dream Taq DNA polimerase (FERMENTAS®) e 10 ng de DNA total. As amplificações foram conduzidas segundo os seguintes parâmetros: desnaturação inicial de 94 °C por 2 min, 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s e 72 °C por 45 s, seguida de uma elongação final a 72 °C por 5 min.

Os produtos de PCR foram clivados com as enzimas de restrição *HinfI*, *MspI* e *Sau3AI* (Promega®). As reações de clivagem foram realizadas em volumes de 15 µL, contendo 10 µL

do produto do PCR; tampão específico para cada enzima 1X, 0,1 µg/µL de BSA (Bovine Serum Albumin) e 0,5 U da enzima de restrição. As reações foram incubadas no Thermomixer (Eppendorf®) a 37 °C por 2 h.

Os fragmentos de DNA foram visualizados após corrida eletroforética em géis de agarose a 3,0 % e de poliacrilamida a 12 %, corados em solução a 0,5 µg/mL de brometo de etídio, e os tamanhos foram estimados por comparação com o marcador GeneRuler 50 bp DNA ladder (FERMENTAS®).

A observação do padrão de bandas no gel foi utilizada para construção de uma matriz binária (1 = presença de banda; 0 = ausência de banda). A partir dessa matriz, foi calculada a dissimilaridade entre os isolados utilizando-se o complemento do índice de Jaccard para posterior agrupamento dos isolados pelo método UPGMA (CRUZ, 2008).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da Capacidade de Produção de Gliotoxina pelas Cepas de *Aspergillus fumigatus*

Foi possível detectar a produção de gliotoxina em todas as cepas isoladas de silagem de milho (5/5), clínicas humana (7/7) e clínicas de animal (8/8). Enquanto, 92 % (12/13) das cepas isoladas de cereais, 84 % (11/13) de ração animal e 71 % (5/7) das cepas de silagem de sorgo produziram quantidade detectável de gliotoxina através da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) (Tabelas 4 e 9).

Tabela 4: Produção de gliotoxina por cepas de *Aspergillus fumigatus* de diferentes origens

Origem	Cepas	Gliotoxina ($\mu\text{g/g}$)		
		Mediana	Valor máximo	Valor mínimo
Ração animal	AF06, AF08, AF11, AF15, AF17, AF19, AF01, AF04, 27cc, 33cc, 51cc, 56cc, 59cc	4,3	29,6	0,6
Cereais	AF05, AF07, AF10, AF12, AF14, AF18, AF20, AF23, AF32, AF37, AF51, AF69, AF86	4,1	21,7	0,8
Silagem milho	AF94, AF108, AF123, AF124, AF131	12,9	57,8	0,7
Silagem sorgo	AF104, AF105, AF120, AF133, AF50/06, AF50/21, AF50/27	1,9	3,8	0,4
Clínica humana	AF113, AF114, AF115, AF116, AF117, AF118, AF119	22,5	30,6	10,4
Clínica animal	AF87, AF88, AF89, AF90, AF91, AF92, AF93, AF122	3,1	5,2	2,2

Entre as distintas origens das cepas de *Aspergillus fumigatus* analisadas, todas as sete cepas de origem clínica humana foram capazes de produzir gliotoxina, e seis dessas produziram mais de 20 $\mu\text{g/g}$ da toxina (Tabela 9). A gliotoxina foi previamente detectada em pulmões, e em soros de camundongos e de humanos infectados com *A. fumigatus* (KUPFAHL et al, 2006; LEWIS et al, 2005a).

Não houve detecção da produção de gliotoxina em apenas 9 % (5/53) das cepas, que foram: duas cepas de silagem de sorgo (AF50/21, AF50/27), duas cepas de ração animal (51cc, 56cc) e uma cepa de cereais (AF23) (Tabela 9). Lewis et al. (2005b) demonstraram que isolados ambientais de *A. fumigatus* raramente produzem gliotoxina, em contraste com os isolados clínicos. Porém, em estudo posterior foi demonstrada que a grande maioria (> 96%) de ambos isolados (clínico e ambiental) são capazes de produzir essa toxina (KUPFAHL et al., 2008), o que corrobora com esse estudo, já que 91 % (48/53) das cepas testadas de *Aspergillus fumigatus* foram capazes de produzirem quantidade detectável da gliotoxina.

Ainda sobre a diferença quanto a capacidade em produzir gliotoxina entre cepas ambientais e clínicas, em comparação de transcriptomas de fungos patogênicos durante infecções de órgãos e tecidos, foi constatado que muitos genes envolvidos no metabolismo primário de fungos patogênicos foram expressos diferentemente durante a infecção de

humanos e plantas (CAIRNS et al., 2010), por isso os pesquisadores acreditaram haver uma reprogramação fisiológica quando se trata de fungos que invadem tecidos (CAIRNS et al., 2010). Tal fato pôde ser evidenciado com os resultados desse estudo, já que todas as cepas clínicas (humanas e de animal) foram capazes de produzir a gliotoxina, e aquelas isoladas de amostras clínica humana foram capazes de produzir mais de 20 µg/g da gliotoxina, porém a cepa AF94 (silagem de milho) foi a que apresentou maior produção de gliotoxina (57,8 µg/g) (Tabela 9).

Os resultados da Análise de Variância (ANOVA) indicaram que houve diferenças significativas ($p < 0.0001$) entre os níveis de produção de gliotoxina das diferentes cepas de *A. fumigatus* segundo suas origens (Tabelas 5 e 6). Com o teste da diferença mínima significativa (least significant difference (LSD) test) de Fisher foi demonstrado onde estavam essas diferenças, assim as cepas isoladas de silagem de milho e as clínicas humanas foram as que mais produziram gliotoxina (Tabelas 4 e 6).

Tabela 5: Quadro de análise da variância (ANOVA) da produção de gliotoxina pelas diferentes cepas de *Aspergillus fumigatus* de acordo com suas origens

FV	GL	SQ	QM	F	p-valor
Origens	6	448,69	4,39	2692,13	0,0018

FV: fonte de variação, SQ: soma dos quadrados; gL: graus de liberdade; QM: quadrado médio; F: F de Fisher; p-valor: probabilidade.

Tabela 6: Teste da Diferença Mínima Significativa (DMS) de Fisher entre cepas de *Aspergillus fumigatus* isoladas de diferentes origens (LSD Fisher $\alpha = 0,05$, DMS=11,40018)

Origem	Médias	E.E	LSD
Silagem sorgo	2,04	4,52	a
Clínica animal	3,43	3,57	a
Cevada, malte e radícula	7,81	4,13	a
Ração aves	8,85	3,37	a
Arroz	8,89	4,13	a
Clínica humana	22,82	3,82	b
Silagem milho	23,08	4,52	b

Médias com as mesmas letras não são significativamente diferentes ($p \leq 0.05$), E.E: erro padrão.

A gliotoxina tem sido citada em muitos estudos sobre Aspergilose Invasiva como fator de virulência para *Aspergillus fumigatus* (SUTTON et al., 1994; WARING et al., 1991; MÜLLBACHER et al., 1988). Cepas de *A. fumigatus* que produzem quantidades elevadas de gliotoxina são mais virulentas que aquelas com baixa capacidade de produção da toxina (REEVES et al., 2004). Em concordância com o conceito da virulência, a cepa que produz maior quantidade de gliotoxina tem melhorada sua capacidade em invadir tecido, e nesse estudo 86 % (6/7) das cepas clínicas humanas produziram mais de 20 µg/g de gliotoxina (Tabela 9). A correlação entre a produção de gliotoxina e a virulência de *A. fumigatus* também foi constatada em estudo *in vitro* com larvas de *Galleria mellonella*, uma vez que, as cepas com maior produção da toxina foram capazes de causar maior mortalidade das larvas (REEVES et al., 2004).

Na Argentina, cepas isoladas de alimentos para gado, cavalos e animais de estimação foram capazes de produzir gliotoxina (PENA et al., 2010). Essa toxina também foi constatada

nesse estudo e ela pode afetar a saúde e a produtividade animal, além disso, há riscos de contaminação para os trabalhadores rurais durante de manipulação e armazenamento desses alimentos contaminados (PENA et al., 2010).

Com base em dados *in vitro*, a produção de gliotoxina *in vivo* sugere que o acesso a açúcares fermentáveis estimula a produção desta toxina pelo *A. fumigatus* (WILLGER et al., 2009). E tal fato pode ter sido constatado nesse estudo, já que o açúcar redutor foi detectado em 70 % (37/53) das cepas que produziram amilase (Tabela 9). E dentre essas cepas 86 % (6/7) das de origem clínica humana foram capazes de produzir mais de 20 µg/g de gliotoxina (Tabela 9).

4.2 Análise Enzimática de Cepas de *Aspergillus fumigatus* de Diferentes Origens

4.2.1 Produção de amilase

Foi feita uma verificação quanto ao pH do meio líquido enriquecido com amido solúvel onde as cepas foram inoculadas para o teste de produção de amilase, através da solução de bromotimol em que ao adicionar uma a duas gotas dessa solução no meio, na presença de ácido, o líquido se corava em amarelo (Figura 1). Em nenhuma inoculação das cepas de *Aspergillus fumigatus* foi obtida essa coloração, ou seja, não houve produção de ácido no meio (Tabela 9).

A glicose quando reage com o iodo e é aquecida forma um precipitado vermelho tijolo, e nesse estudo foi possível verificar que aos 14 dias um número maior de cepas testadas para presença de açúcar redutor apresentou esse composto (Tabela 7), sendo que 100% (7/7) das cepas clínicas humanas o apresentaram, enquanto apenas 23% das cepas de alimento destinado ao consumo animal obtiveram o mesmo composto (Tabelas 7 e 9, Figura 1). A presença de açúcar redutor sofreu influência do tempo, já que cepas que não apresentaram açúcar redutor aos sete dias, a presença do composto foi constatada aos 14 dias, isso ocorreu em 86% das cepas de silagem de sorgo, 100% de clínicas humanas e 75% das cepas isoladas de amostras clínica animal (Tabelas 7 e 9).

Tabela 7: Hidrólise de amido por cepas de *Aspergillus fumigatus* de diferentes origens

Origem das cepas	Hidrólise amido (%)*			
	Positivas para hidrólise		Presença de açúcar redutor	
	7 dias	14 dias	7 dias	14 dias
Ração animal	9/13 (69)	13/13 (100)	1/13 (8)	3/13 (23)
Cereais	10/13 (77)	13/13 (100)	3/13 (23)	10/13 (77)
Silagem milho	6/7 (86)	7/7 (100)	2/7 (29)	5/7 (71)
Silagem sorgo	7/7 (100)	7/7 (100)	0/7	6/7 (86)
Clínica humana	5/7 (71)	7/7 (100)	0/7	7/7 (100)
Clínica animal	6/8 (75)	7/8 (88)	0/7	6/8 (75)

*N/N₁: N número de cepas positivas e N₁ número de cepas testadas.

4.2.2 Produção de celulase

Todas as cepas testadas quanto a formação de conídio no papel filtro para hidrólise de celulose foram positivas (Tabela 9 e Figura 4), com exceção de uma cepa de ração animal (27cc), isolada de polpa cítrica para o consumo de bovino leiteiro. Tal resultado corrobora com estudo realizado em 2001, que das 15 cepas de *Aspergillus fumigatus* testadas para a produção de celulase extracelular todas foram capazes de produzir essa enzima quando testadas em papel filtro imerso em Agar Czapek (KRIKŠTAPONIS et al., 2001).

Apenas uma cepa isolada de cereais (AF07) apresentou o pH ácido no Meio Omelianski (Tabela 9 e Figura 1).

Tabela 8: Hidrólise de celulose pelo teste de Vermelho Congo, detecção de açúcar redutor no meio Omelianskii após 21 dias; e hidrólises de lipídio, caseína e gelatina por cepas de *A. fumigatus* isoladas de diferentes origens

Origem das cepas	Hidrólise (% positivas)					
	Celulose		Lipídio	Caseína	Gelatina	
	Presença Açúcar redutor	Vermelho congo (CMC)			7 dias	14 dias
Ração animal	1/13 (8)	6/13 (46)	12/13 (92)	2/13 (15)	5/13 (39)	7/13 (54)
Cereais	7/13 (54)	12/13 (92)	13/13 (100)	3/13 (23)	4/13 (31)	8/13 (62)
Silagem milho	3/5 (60)	4/5 (80)	5/5 (100)	1/5 (14)	4/5 (80)	5/5 (100)
Silagem sorgo	4/7 (57)	6/7 (86)	7/7 (100)	0	1/7 (14)	5/7 (71)
Clínica humana	3/7 (43)	7/7 (100)	7/7 (100)	1/7 (14)	6/7 (86)	7/7 (100)
Clínica animal	5/8 (63)	8/8 (100)	8/8 (100)	3/8 (38)	8/8 (100)	8/8 (100)

*N/N₁: N número de cepas positivas e N₁ número de cepas testadas.

Também foi utilizado o Agar carboximetilcelulose (CMC) para verificar a produção de celulase (Tabela 8). Essa verificação foi realizada através da formação de um halo amarelo ao redor da colônia após coloração com uma solução de vermelho congo que era colocada na placa e depois lavada com uma solução salina. Assim, quando havia a formação do halo amarelo este era medido e a cepa era considerada positiva para produção de celulase (Figura 5).

Dez cepas não apresentaram o halo após a coloração com o vermelho congo, sendo negativas para a produção de celulase (Tabelas 8 e 9), dessas cepas positivas todas aquelas isoladas de amostras clínicas (tanto humana quanto animal) produziram celulase pelo teste com o Agar CMC (Tabelas 8 e 9). Quarenta e uma cepas formaram halo amarelo com até 2,0 mm de espessura, uma cepa de cereais (AF37 – arroz) e uma de ração animal (27cc) apresentaram halo de 6,0 mm e 10,0 mm, respectivamente (Tabela 9).

4.2.3 Produção de lipase

Em estudo para avaliar a produção da lipase extracelular por cepas de *Aspergillus fumigatus* foi constatado que com 5 dias, 87% das cepas foram capazes de produzi-la, enquanto que aos 28 dias de teste todas foram capazes de produzir essa enzima (KRIKŠTAPONIS et al., 2001). A medição do halo translúcido realizada neste estudo também foi realizada aos 5 dias, e 98 % (52/53) das cepas estudadas foram positivas, apenas uma cepa (AF15) foi negativa, isolada de ração animal destinada a aves (Tabelas 8 e 9). Halo de até 2,0 mm foi obtido em vinte e seis cepas (49%), dezesseis cepas (30%) obtiveram halo de 3,0 a 5,0 mm (Tabela 9). Boa produção de lipase foi obtida de dez cepas (19 %) com halo maior que 5,0 mm, dentre elas estavam: uma de ração animal (com 10,0 mm, isolada de polpa cítrica 27cc), cinco cepas isoladas de cereais (arroz), duas isoladas de silagem de milho e duas de sorgo (Tabela 9 e Figura 7).

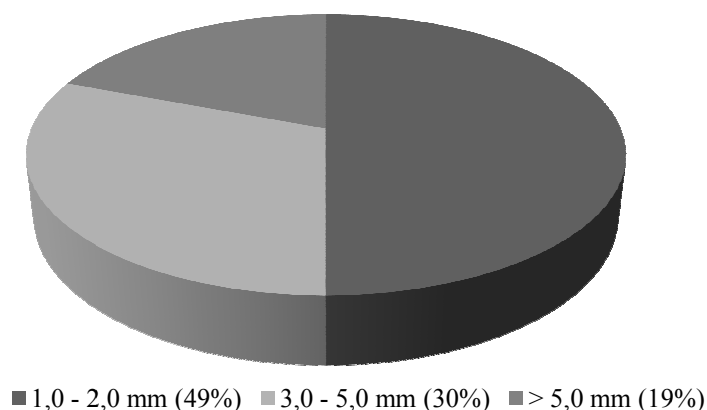


Figura 7: Porcentagens das cepas segundo os valores dos halos de hidrólise de lipídio (mm).

Quando se trata de cepas clínicas, devido a falta de nutrientes que pode ocorrer no local de infecção há ativação do ciclo do glioxilato para obtenção de hidratos de carbono a partir dos lipídios disponíveis no ambiente (WILLGER et al., 2009). Tal fato foi corroborado neste estudo, já que todas as cepas clínicas na presença da fonte lipídica como única fonte de carbono foram capazes de produzir lipase. No entanto, esse dado pode ser extrapolado para as cepas de todas as origens, uma vez que foi obtida produção da lipase por 98 % (52/53) das cepas (Tabelas 8 e 9).

4.2.4 Produção de gelatinase e caseinase

Quanto a produção da caseinase, 21 % (11/53) das cepas foram positivas (Tabelas 8 e 9), dentre as cepas isoladas de amostra clínica animal (mastite bovina) estas foram as que mais se apresentaram positivas (3/8) para a produção da caseinase (Tabela 8), o que pode ter uma correlação direta, já que essas cepas foram isoladas do úbere da vaca com mastite bovina e se trata de um micro-ambiente rico nessa proteína (Figura 6).

As cepas isoladas de origem clínica, tanto animal quanto humana, foram as que mais apresentaram capacidade em produzir gelatinase (Tabelas 8 e 9). Quando ocorre falta de nutrientes no local de infecção (tecido do hospedeiro), ela pode ser compensada pela degradação de proteínas para aquisição de aminoácidos e biossíntese de proteínas (WILLGER et al., 2009). Além disso, é provável que *Aspergillus fumigatus* obtenha nutrientes *in vivo* a partir da destruição de tecidos do hospedeiro (WILLGER et al., 2009). Essa função proteolítica foi constatada pelas cepas de origem clínica desse estudo, e pode estar relacionada ao fato de se tratarem de cepas invasivas que apresentaram atividade proteolítica o que facilita a invasão e colonização tecidual.

Tabela 9: Resultados obtidos da análise enzimática e da produção de gliotoxina ($\mu\text{g/g}$) das cepas de *Aspergillus fumigatus* *

Origem	Cepas	Produção amilase (HA)						HG		HCAS	Produção celulase (HC)				HPh	Gli
		AArs	AArq	AAs	AAq	HAs	HAq	HGs	HGq		HCv	CAr	CA	VG		
Ração Animal	AF06	-	-	-	-	Parcial	Total	-	+	-	+	-	-	-	0,3	5,1
	AF08	-	-	-	-	Total	Total	+	+	+	++	-	-	-	0,2	2,9
	AF11	-	-	-	-	Total	Total	+	+	-	++	-	-	-	0,2	4,5
	AF15	-	-	-	-	Total	Total	-	-	-	++	-	-	-	0,2	4,6
	AF17	-	-	-	-	Parcial	Total	-	-	-	++	-	-	-	-	1,9
	AF19	-	+	-	-	-	Total	++	++	-	++	+	-	0,1	0,3	2,2
	AF01	-	-	-	-	-	Total	-	-	-	++	-	-	-	0,5	29,6
	AF04	-	-	-	-	Total	Total	-	+	-	++	-	-	0,1	0,1	27,8
	27cc	-	-	-	-	Parcial	Total	++	++	+	-	-	-	1,1	1,0	1,2
	33cc	-	+	-	-	-	Total	-	-	-	++	-	-	0,1	0,1	0,6
	51cc	-	-	-	-	Total	Total	+	+	-	+	-	-	0,1	0,4	Nd
	56cc	+	+	-	-	Parcial	Total	-	-	-	++	-	-	0,1	0,4	Nd
	59cc	-	-	-	-	-	Total	-	-	-	++	-	-	-	0,4	4,4
Cereais	AF05	-	+	-	-	-	Total	-	+	-	+	-	-	0,2	0,1	4,3
	AF07	+	+	-	-	Total	Total	-	-	-	+	+	+	-	0,3	20,1
	AF10	-	-	-	-	Parcial	Total	-	-	-	+	+	-	0,1	0,3	0,8
	AF12	-	-	-	-	Parcial	Total	-	-	-	+	+	-	0,2	0,2	1,6
	AF14	-	+	-	-	-	Total	-	-	-	++	-	-	0,1	0,1	18,0
	AF18	+	+	-	-	Parcial	Total	-	+	+	++	+	-	0,2	0,3	2,0
	AF20	-	+	-	-	Total	Total	+	+	+	++	+	-	0,2	0,8	21,7
	AF23	-	-	-	-	-	Total	-	+	-	++	+	-	0,1	0,6	Nd
	AF32	-	+	-	-	Parcial	Total	-	+	+	++	-	-	0,2	0,2	12,1
	AF37	+	+	-	-	Total	Total	++	++	-	+	-	-	0,6	0,5	11,1
	AF51	-	+	-	-	Parcial	Total	+	+	-	++	+	-	0,2	0,6	3,2
	AF69	-	+	-	-	Parcial	Parcial	-	-	-	++	-	-	0,1	0,8	3,8
	AF86	-	+	-	-	Total	Total	++	++	-	++	-	-	0,2	0,7	1,4

Tabela 9: Contin.

Silagem Milho	AF94	+	+	-	-	Total	Total	+	+	-	++	-	-	-	0,6	57,8
	AF108	+	+	-	-	Total	Total	-	+	-	+	+	-	0,1	0,3	0,7
	AF123	-	+	-	-	-	Total	+	++	-	++	-	-	0,1	0,2	31,2
	AF124	-	+	-	-	Total	Total	+	++	-	+	-	-	0,1	0,4	12,9
	AF131	-	+	-	-	Parcial	Parcial	+	++	-	++	+	-	0,1	0,8	12,9
Silagem Sorgo	AF104	-	+	-	-	Total	Total	-	+	+	++	+	-	0,2	0,6	1,9
	AF105	-	+	-	-	Total	Total	-	+	-	++	+	-	0,2	0,6	3,0
	AF120	-	+	-	-	Total	Total	-	-	-	++	-	-	-	0,3	1,1
	AF133	-	+	-	-	Total	Total	-	-	-	++	+	-	0,1	0,2	3,8
	AF50/06	-	+	-	-	Total	Total	-	+	-	++	+	-	0,2	0,2	0,4
	AF50/21	-	+	-	-	Total	Total	-	+	-	++	-	-	0,1	0,2	Nd
	AF50/27	-	-	-	-	Total	Total	++	++	+	++	-	-	0,2	0,2	Nd
Clínica Humana	AF113	-	+	-	-	Total	Total	+	++	-	+	+	-	0,2	0,2	25,4
	AF114	-	+	-	-	Total	Total	-	+	+	++	-	-	0,2	0,1	10,4
	AF115	-	+	-	-	-	Total	+	+	-	++	-	-	0,1	0,1	22,5
	AF116	-	+	-	-	Total	Total	+	+	-	++	-	-	0,1	0,1	29,6
	AF117	-	+	-	-	-	Total	+	+	-	++	-	-	0,1	0,2	30,6
	AF118	-	+	-	-	Parcial	Total	+	+	-	++	+	-	0,1	0,1	21,1
	AF119	-	+	-	-	Total	Total	+	+	-	++	+	-	0,1	0,1	20,2
Clínica Animal	AF87	-	+	-	-	-	-	++	+	+	++	+	-	0,1	0,3	2,2
	AF88	-	+	-	-	Total	Total	+	+	-	++	+	-	0,1	0,2	3,9
	AF89	-	+	-	-	Total	Total	+	+	-	++	+	-	0,2	0,2	5,2
	AF90	-	-	-	-	-	Total	+	+	+	++	-	-	0,1	0,2	2,4
	AF91	-	+	-	-	Parcial	Total	+	++	-	++	+	-	0,1	0,2	3,1
	AF92	-	-	+	-	Total	Total	+	+	-	++	-	-	0,1	0,2	5,1
	AF93	-	+	-	-	Parcial	Total	++	++	+	+	+	-	0,1	0,3	2,5
	AF122	-	+	-	-	Parcial	Parcial	+	+	-	++	-	-	0,2	0,4	3,1

***Legenda:**

Produção Amilase (HA): HAs = com 07 dias, HAq = com 14 dias, AArS = presença de açúcar redutor com 07 dias, AArq = presença de açúcar redutor com 14 dias, AAs = presença de ácido com 07 dias, AAq = presença de ácido com 14 dias.

Produção Gelatinase (HG): HGs = com 07 dias, HGq = com 14 dias. Produção Celulase (HC): HCv = presença de conídio no papel filtro com 21 dias, CAr = presença de açúcar redutor, CA = presença de ácido, VG = presença e tamanho (cm) do halo no Agar CMC depois da coloração pelo vermelho congo. Produção Lipase (HPh) = presença e tamanho (cm) do halo no Agar Spirit Blue. Produção caseinase (HCAS) = formação de halo no Agar leite.

Produção de gliotoxina (Gli): em µg/g. (-) = negativo; (+) e (++) = positivo; (nd) = não detectável.

4.3 Estudo de Correlação entre as Variáveis Enzimáticas e a Produção de Gliotoxina

A Tabela 2 mostra a atribuição de siglas (HAs, HAq, AArS, AArq, AAs, AAq, HGs, HGq, HCs, HCq, HCv, CAr, CA, VG, HPh, HCAS, Gli) de acordo com o tipo de enzima produzida, o produto detectado e o tempo, além da produção de gliotoxina. Também ilustra como as variáveis foram expressas e analisadas de forma qualitativa para análise descritiva (Tabela 2).

Foi feito teste de correlação de Pearson com todas as variáveis em que os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos, indicando correlação entre variáveis. Assim quando se tem variáveis correlacionadas pode-se selecionar uma delas, já que estariam dando resultados similares, o que diminui a amostragem para a análise multivariada (Tabela 10). Assim as variáveis grifadas em cinza na Tabela 10 foram excluídas da análise multivariada.

Tabela 10: Variáveis que se correlacionaram e seus respectivos p-valores

Variáveis correlacionadas	p-valor
HGq – HGs	0,00169188
HCq – HCs	0,00028048
HCv – HCs	0,00338434
HCv – HCq	0,00020045
CAr - AArq	0,02703092
CA – AArS	0,00451225
HCAS – AArq	0,01128074
HCAS – HPh	<0,0001
VG – AArq	0,01702631
Gli – AArq	0,03864361

4.3.1 Análise multivariada - Análise dos componentes principais (ACP)

O agrupamento de objetos multivariados é usado como método exploratório de dados para conhecer a estrutura das observações e/ou variáveis do estudo. Quando se dispõe de numerosas variáveis para realizar o agrupamento, é comum aplicar técnicas de redução de dimensão tal como a Análise de Componentes Principais (ACP), para assim obter número menor de variáveis capazes de expressar a variabilidade dos dados.

Os resultados foram expressos em gráficos Biplot. Quando a soma dos componentes principais (CP1 + CP2) se aproxima de 60%, significa que o resultado é confiável. Assim, de acordo com a análise do gráfico de ACP entre as amostras clínicas, pode-se dizer que as cepas clínicas animal são melhores caracterizadas pela variável produção de caseinase (HCAS) (Figura 8). Tal fato é pertinente já que o meio em que se desenvolvem cepas origem clínica animal (mastite bovina) é um meio rico nesse tipo de proteína. Enquanto as cepas de origem clínica humana foram melhores caracterizadas pela variável produção de gliotoxina (Gli) (Figura 8). A gliotoxina tem sido relatada como fator de virulência para cepas isoladas de Aspergilose Invasiva (AI), o que pode caracterizá-la melhor por se tratar de cepas invasivas. Pela análise do ACP entre as amostras de silagens (Figura 9) se verifica melhor caracterização das cepas de silagem de milho pela variável produção de gliotoxina (Gli), enquanto a variável Hidrólise de Gelatina (HGs) melhor caracteriza as cepas isoladas de silagem de sorgo.

Quando foram relacionadas cepas de origens clínicas (humana e animal) e silagens (milho e sorgo), pela análise do gráfico de ACP (Figura 10), a variável produção de gliotoxina (Gli) melhor caracterizou as cepas de origem clínica humana, como observado na figura 9, assim como aquelas isoladas de silagem de milho. De acordo com análise estatística as cepas isoladas de silagem de milho e clínicas humanas foram aquelas que mais produziram gliotoxina (Tabela 6). Cepas isoladas de silagem de sorgo são melhores caracterizadas pela variável produção de gelatinase (HGs) (Figura 9).

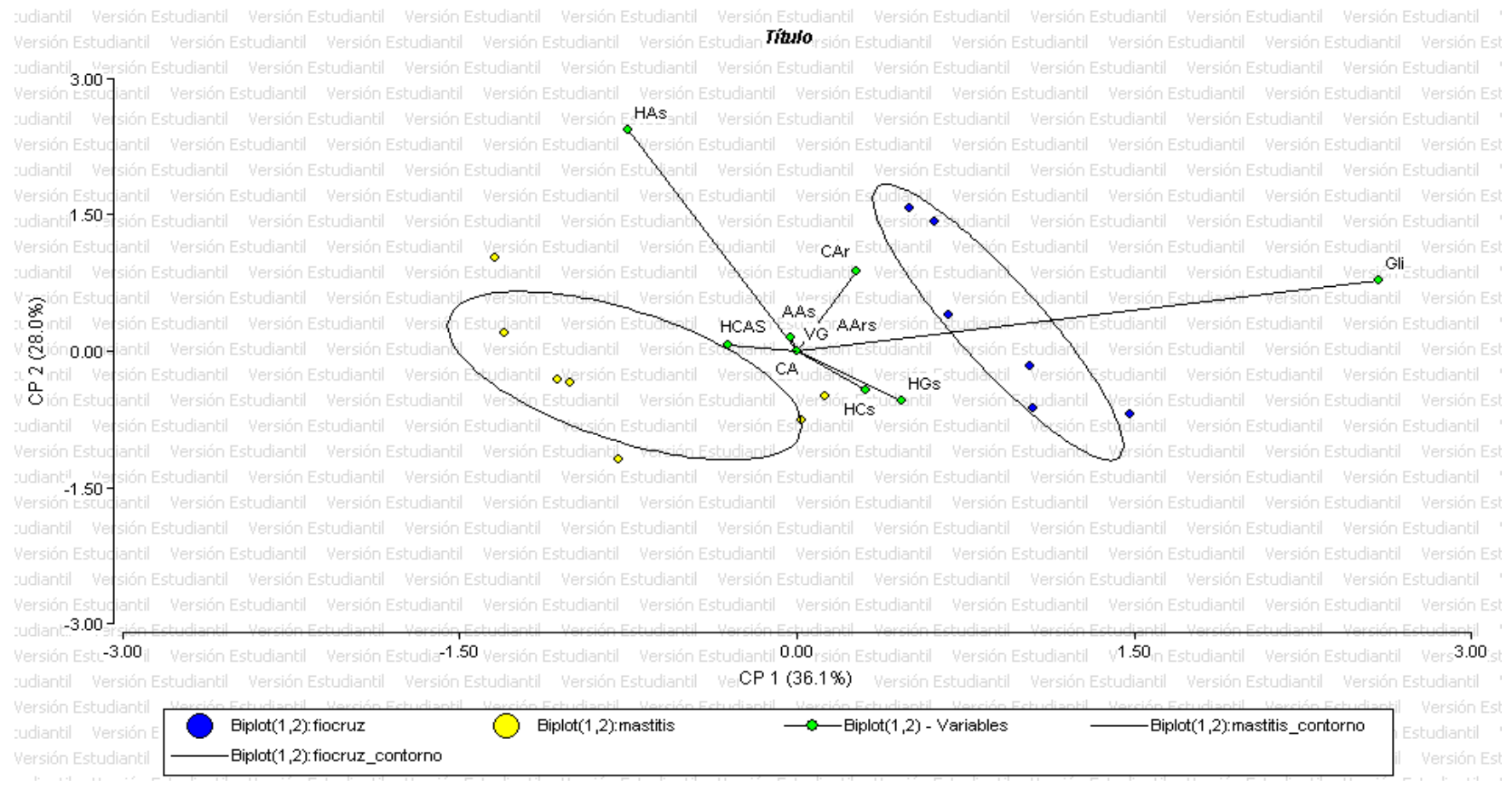


Figura 8: Gráfico Bipolt da Análise dos componentes principais entre as amostras clínicas: humanas (FIOCRUZ - pontos azuis) e de animal (mastite bovina – pontos amarelos).

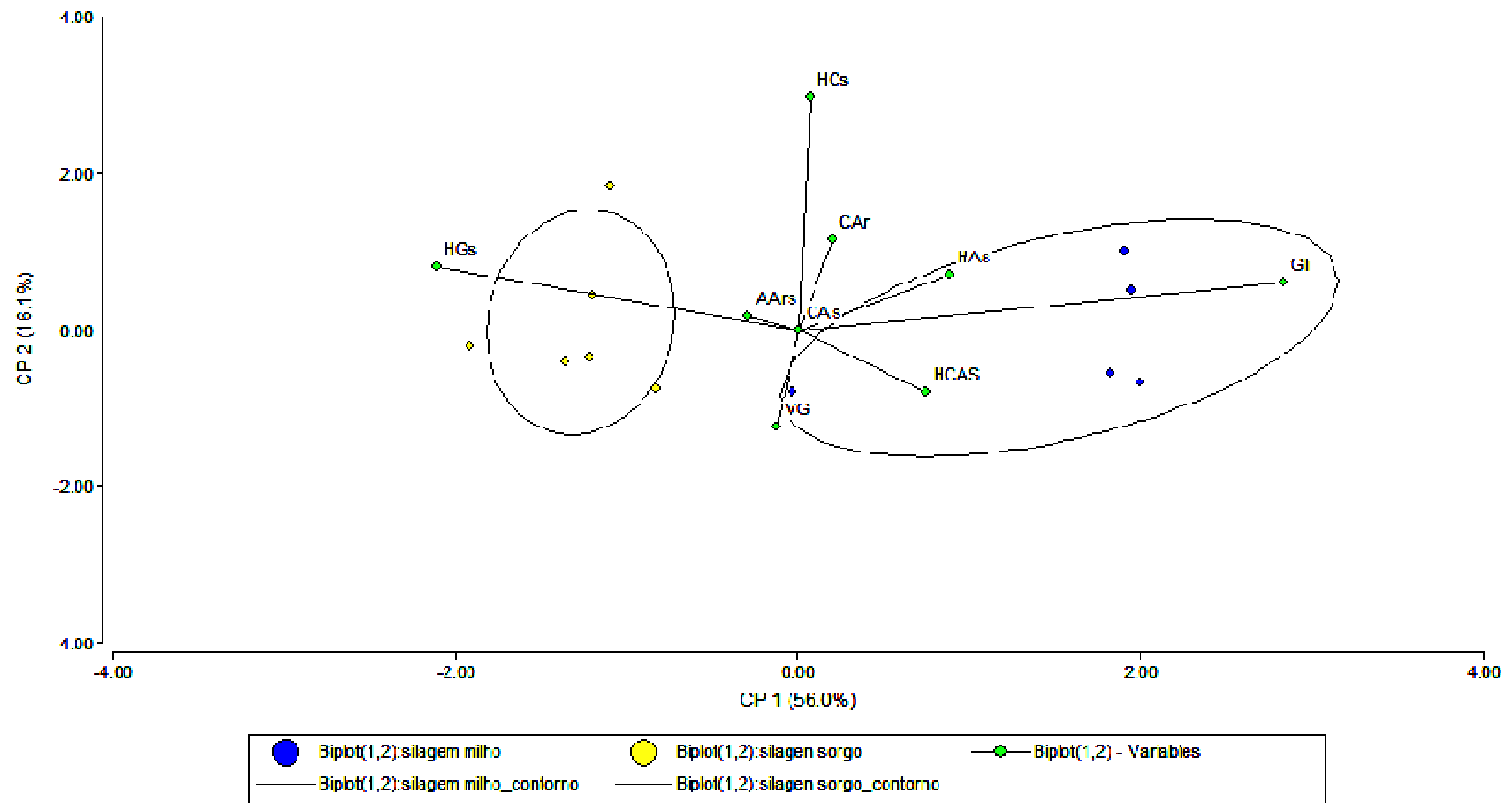


Figura 9: Gráfico Biplot da Análise dos Componentes Principais entre as amostras isoladas de silagem milho (pontos azuis) e silagem sorgo (pontos amarelos).

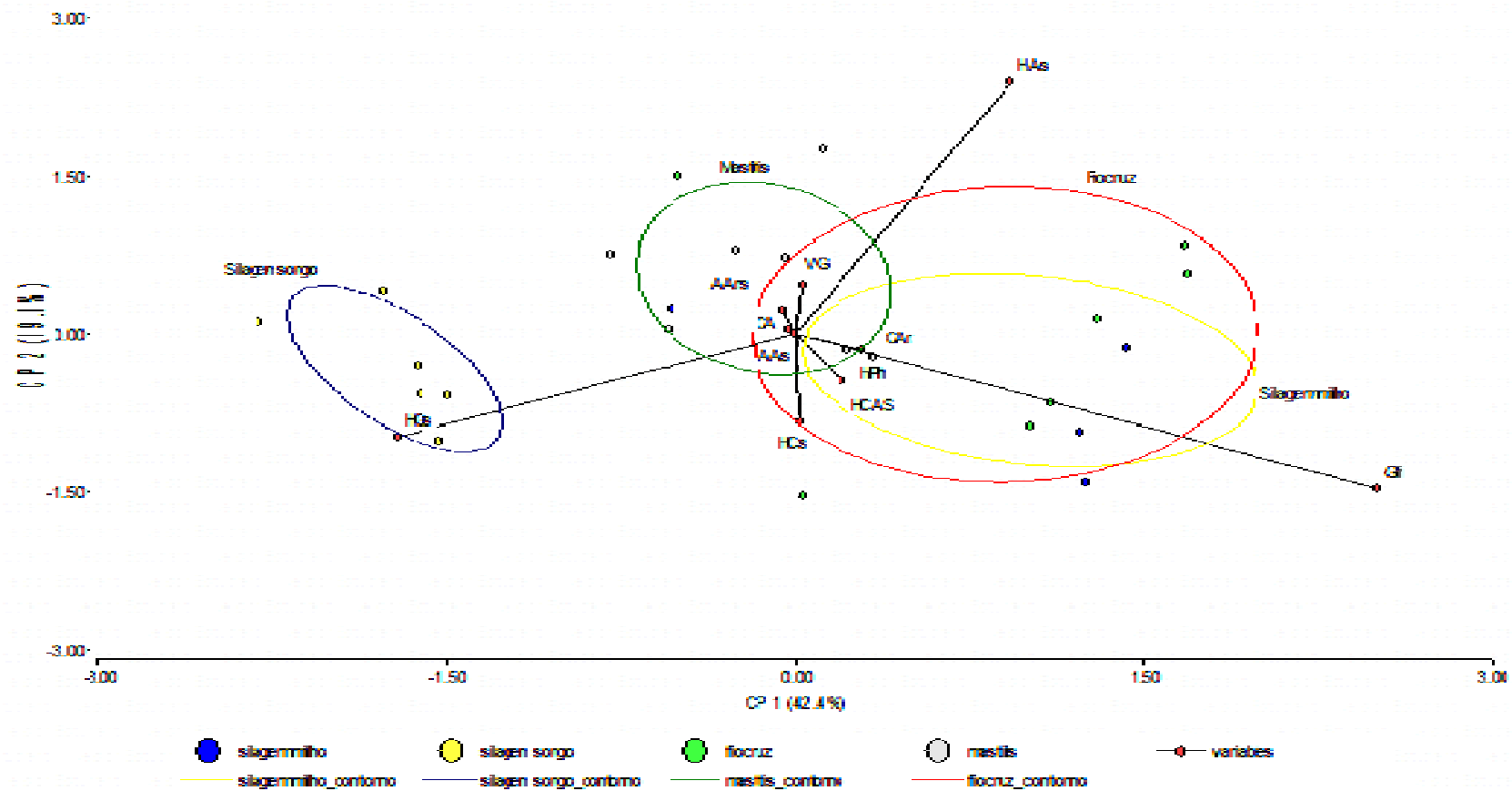


Figura 10: Gráfico Biplot da Análise dos Componentes Principais entre as amostras de origem clínica (humanas / FIOCRUZ = pontos verdes e animal / mastite bovina = pontos brancos) e silagens (sorgo = pontos amarelos e milho = pontos azuis).

4.4 Caracterização de Cepas de *Aspergillus fumigatus* por PCR-RFLP (*Polimerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length’ Polymorphism*)

4.4.1 Análise *in silico* dos perfis de restrição

Após análise *in silico* da clivagem de sequências de DNA do gene *benA*, foi observado que as enzimas *BccI*, *HinfI*, *MspI* e *Sau3AI* geraram padrões de restrição distintos para as três espécies do gênero *Aspergillus* avaliadas (*A. fumigatus*, *Neosartorya udagawae* e *A. lentulus*) (Tabela 11). Dessa forma, essas quatro enzimas de restrição se mostraram promissoras para serem utilizadas para diferenciação das espécies descritas acima.

4.4.2 PCR-RFLP do gene *benA* que codifica a proteína β -tubulina de cepas de *Aspergillus fumigatus*

Todos os isolados de *Aspergillus fumigatus* foram amplificados utilizando os iniciadores β tub1 e β tub2 (STAAB et al., 2009) gerando um fragmento de aproximadamente 500 pb (Figura 11).

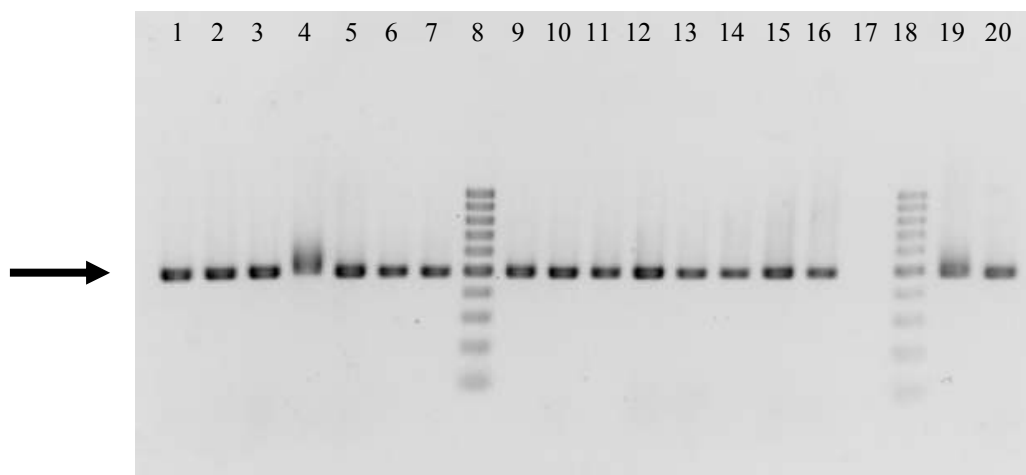


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose 1,5 % dos produtos de amplificação do gene β -tubulina de isolados de *Aspergillus fumigatus*. 1-7, 9-17, 19 e 20: isolados de *A. fumigatus*, 8 e 18: marcador de peso molecular de 100 pb, 17: controle negativo. Fragmentos de tamanho aproximado de 500 pb de acordo com o ladder de 100 pb (colunas 8 e 18).

Os produtos de PCR obtidos de cada cepa de *A. fumigatus* foram clivados, separadamente com quatro enzimas de restrição *BccI*, *MspI*, *HinfI* e *Sau3AI* (Tabela 12). Todas as cepas produziram o padrão de bandas esperado pela clivagem *in silico* gerado com a sequência de *Aspergillus fumigatus* (Figuras 12 e 13).

Após clivagem dos produtos de gene *benA* com a enzima *BccI* foi possível observar três fragmentos com aproximadamente 99 pb, 144 pb e 249 pb (Figura 12). Com a enzima *MspI* foram observados duas bandas com aproximadamente 35 pb e 457 pb (Figura 13). Já com a enzima de restrição *HinfI* e *Sau3AI*, foram observadas, respectivamente, duas bandas de aproximadamente 121 pb e 371 pb, e quatro bandas de aproximadamente 57 pb, 70 pb, 86 pb e 222 pb (Figuras 14 e 15).

Tabela 11: Sequências do gene *benA* e suas respectivas espécies, com os tamanhos de fragmentos gerados após clivagens com as enzimas de restrição *BclI*, *MspI*, *HinfI* e *Sau3AI*

Número de acesso GenBank	Espécies	Tamanho dos fragmentos gerados (pb) após análise <i>in silico</i>			
		<i>BclI</i>	<i>HinfI</i>	<i>MspI</i>	<i>Sau3AI</i>
HQ588166.1	<i>Aspergillus fumigatus</i>	99, 144, 249	34, 121, 336	35, 457	57, 70, 86, 222
HQ127276.1	<i>Neosartorya udagawae</i>	39, 46, 60, 346	34, 121, 336	24, 35,432	57, 70, 85, 279
HQ127275.1	<i>Aspergillus lentulus</i>	39, 105, 348	34, 121, 336	24, 35,433	70, 144, 278

O uso dessa técnica foi suficiente para discriminação entre as espécies *Aspergillus fumigatus*, *Neosartorya udagawae*, *A. lentulus*, que são espécies muito parecidas morfológicamente. A distinção entre essas três espécies, é de suma importância uma vez que elas apresentam suscetibilidades distintas aos antimicóticos usados rotineiramente em Aspergilose Invasiva Humana.

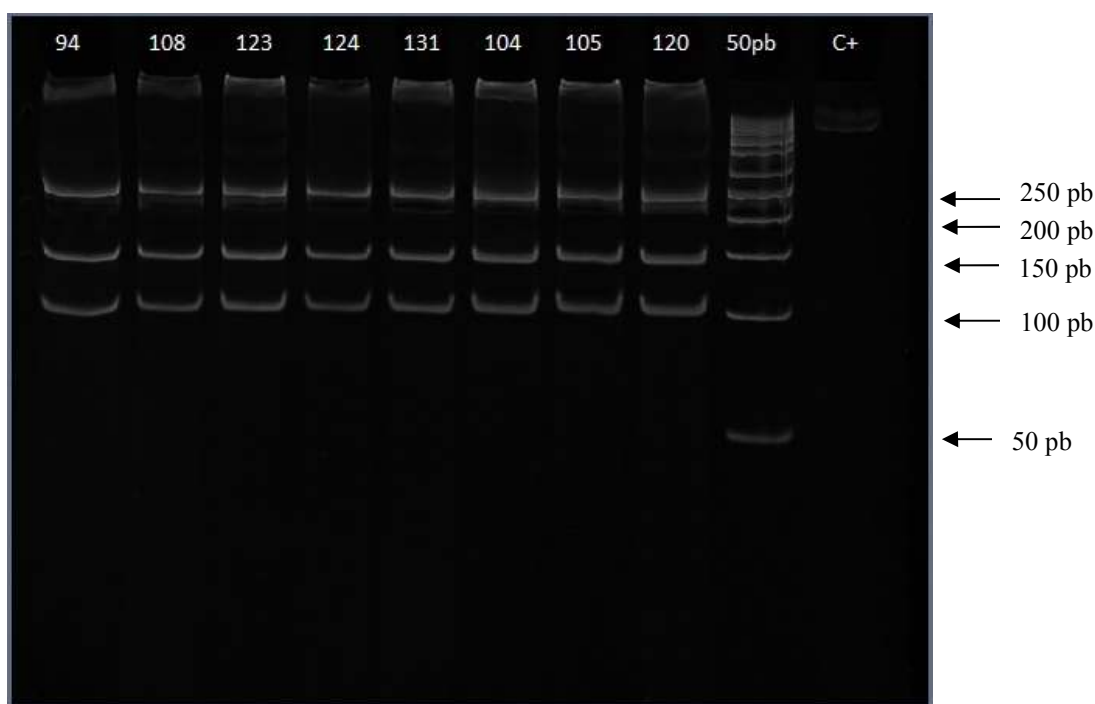


Figura 12: Eletroforese em gel de poliácridamida 40 % após clivagem com a enzima de restrição *BclI* dos produtos de amplificação do gene *benA* de isolados de *Aspergillus fumigatus*. 94, 108, 123, 124, 131, 104, 105, 120: produtos de amplificação do gene β -tubulina de isolados de *Aspergillus fumigatus* após clivagem com *BclI*. 50 pb: marcador de peso molecular de 50 pb. C+: produto de amplificação do gene β -tubulina de isolado de *Aspergillus fumigatus* sem clivagem com *BclI*.

Aspergillus fumigatus continua sendo a causa mais frequente de Aspergilose Invasiva Humana, no entanto outras espécies, como *A. flavus*, *A. terreus*, *A. niger*, *A. nidulans* e *A. ustus* também foram relatadas como causa dessa infecção (HENRY et al., 2000). Quando avaliado o uso da amplificação da região ITS (com os iniciadores universais ITS1 e ITS4) e

posterior clivagem com enzima de restrição (*HhaI*) houve discriminação entre cinco espécies patogênicas de *Aspergillus* spp. (MIRHENDI et al, 2007). Nesse estudo houve discriminação entre três espécies da Seção *Fumigati*, morfologicamente similares, que podem causar a Aspergilose Invasiva Humana e por isso essa metodologia poderia ser usada na identificação do agente etiológico implicado nessa doença em laboratórios de rotina de diagnóstico microbiológico.

Em estudo realizado para avaliar a presença de espécies do gênero *Aspergillus* em amostras clínicas e ambientais foi possível identificar 8,7% de *A. fumigatus* em amostras clínicas e 7,2% em amostras ambientais com a técnica de PCR-RFLP, em que foi amplificado um gene da região ITS e clivado pela enzima de restrição *MwoI* (DIBA et al., 2008). Já em outro estudo acerca dos fungos filamentosos que infectavam vinícolas, foi possível ter discriminação entre as espécies com a amplificação da região ITS, porém foram necessárias de quatro a oito enzimas de restrição para uma melhor diferenciação entre as espécies (DIGUTA et al., 2011).

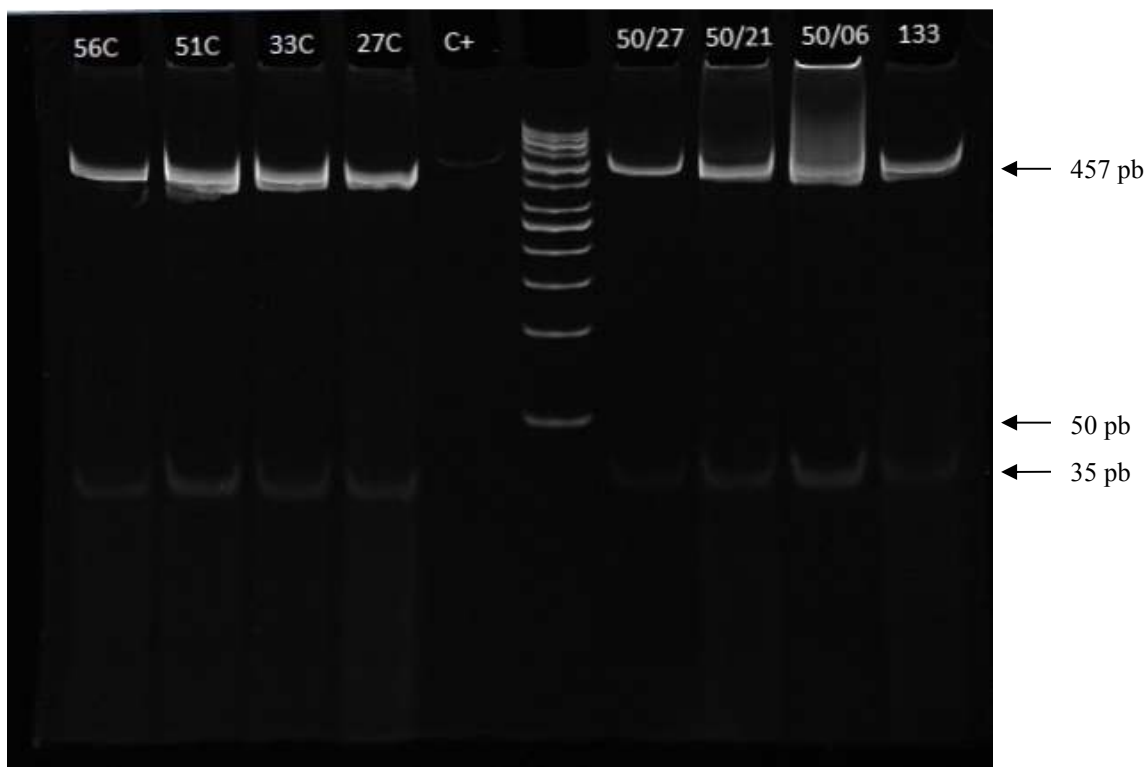


Figura 13: Eletroforese em gel de poliacrilamida 40 % após clivagem com a enzima de restrição *MspI* dos produtos de amplificação do gene *benA* de cepas de *Aspergillus fumigatus*. 56C, 51C, 33C, 27C (cepas isoladas de ração) e 50/27, 50/21, 50/06, 133 (cepas isoladas de silagem): produtos de amplificação do gene *benA* de cepas de *Aspergillus fumigatus* após clivagem com *MspI*. 50pb: marcador de peso molecular de 50 pb. C+: produto de amplificação do gene *benA* de cepa de *Aspergillus fumigatus* sem clivagem com *MspI*.

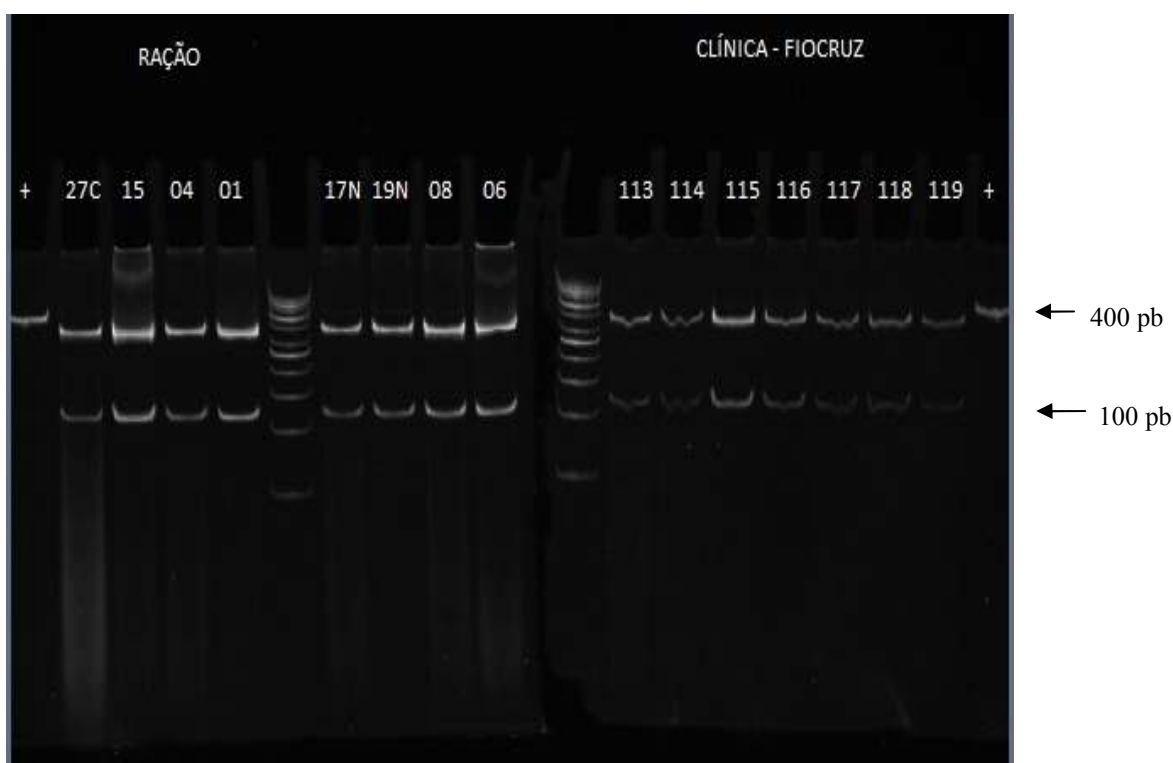


Figura 14: Eletroforese em gel de poliacrilamida 40 % após clivagem com a enzima de restrição *HinfI* dos produtos de amplificação do gene *benA* de cepas de *Aspergillus fumigatus*. 27C, 15, 04, 01, 17N, 19N, 08 e 06 (cepas isoladas de ração) e 113, 114, 115, 116, 117, 118 e 119 (cepas isoladas de amostras clínicas humanas): produtos de amplificação do gene *benA* de isolados de *Aspergillus fumigatus* após clivagem com *HinfI*. 50pb: marcador de peso molecular de 50 pb. +: produto de amplificação do gene *benA* de cepa de *Aspergillus fumigatus* sem clivagem com *HinfI*.

A técnica de PCR-RFLP do gene *benA* utilizada por Staab et al. (2009) e nesse estudo, possibilitou a distinção entre três espécies do gênero *Aspergillus* seção *Fumigati*, uma vez que a enzima de restrição utilizada, *BccI*, gerou um polimorfismo estável entre as espécies analisadas o que a torna um bom marcador para a discriminação de morfotipos de *Aspergillus fumigatus*. Além disso, foram usadas mais duas enzimas de restrição, *MspI* e *Sau3 AI*, que também foram capazes de distinguir cepas de *Aspergillus fumigatus strictu sensu* (Tabela 11).

Em estudo com isolados clínicos morfologicamente identificados por *A. fumigatus* de diferentes regiões geográficas, após análises: genética, da concentração inibitória mínima de antimicóticos e da temperatura de crescimento, foi possível identificar que dentre os 50 isolados, 16 não eram *A. fumigatus*, sendo que oito foram identificados como *A. lentulus* e oito como *A. udagawae* (BALAJEE et al., 2006). Neste estudo os genes *benA* e *rodA* foram amplificados e os produtos de amplificação foram clivados com a enzima *StyI*. Além disso, os produtos de PCR foram sequenciados e as sequências geradas foram comparadas com sequências depositadas no NCBI (National Center for Biotechnology Information) de morfotipos de *Aspergillus fumigatus*, e a técnica de PCR-RFLP usada por Balajee et al. (2006) foi considerada eficaz para diferenciação entre esses morfotipos.

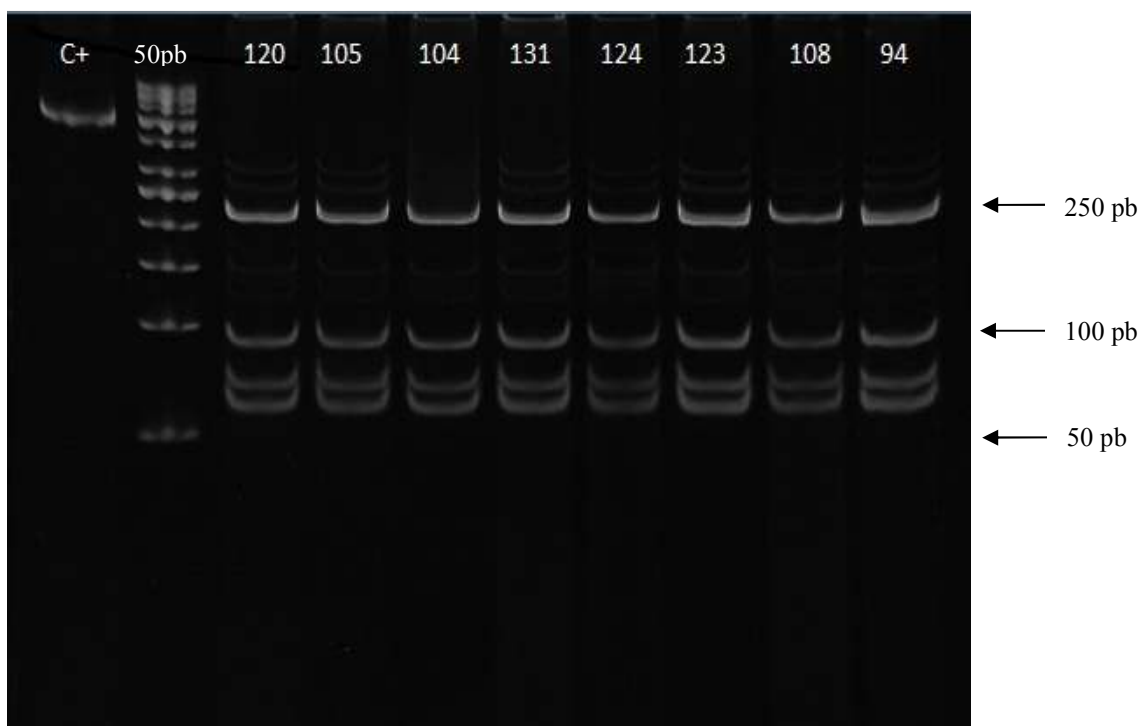


Figura 15: Eletroforese em gel de poliacrilamida 40 % após clivagem com a enzima de restrição *Sau3AI* dos produtos de amplificação do gene β -tubulina de isolados de *Aspergillus fumigatus*. 120, 105 e 104 (cepas isoladas de silagem de sorgo), 131, 124, 123, 108 e 94 (cepas isoladas de silagem de milho) : produtos de amplificação do gene β -tubulina de isolados de *Aspergillus fumigatus* após clivagem com *Sau3AI*. 50pb: marcador de peso molecular de 50 pb. C+: produto de amplificação do gene β -tubulina de isolado de *Aspergillus fumigatus* sem clivagem com *Sau3AI*.

As técnicas de AFLP e ITS PCR-RFLP foram comparadas na análise de espécies do gênero *Ganoderma* (ZHENG et al, 2009). Nessa comparação a técnica de AFLP foi mais sensível e prática, já que produziu um maior número de polimorfismo entre as espécies estudadas, enquanto a técnica de ITS PCR-RFLP até demonstrou variabilidade intra-específica, porém se fez necessário um sequenciamento da região ITS (ZHENG et al., 2009).

A identificação de espécies do gênero *Aspergillus* com base exclusivamente nas características morfológicas é insuficiente e levou ao desenvolvimento de métodos moleculares com esta finalidade. Assim, a técnica de PCR-RFLP usada nesse estudo foi útil para diferenciação entre três espécies pertencentes a Seção *Fumigati*, que estão envolvidas na Aspergilose Invasiva (AI) humana.

5 CONCLUSÕES

Todas as cepas de *Aspergillus fumigatus* de origem clínica foram capazes de produzir gliotoxina em quantidade detectável, e isso pode estar relacionado a patogenicidade dessas cepas, uma vez que a gliotoxina pode ser um fator relevante para causar doença no hospedeiro. Além disso, todas as cepas de origem clínica humana produziram uma maior quantidade da toxina, acima de 20 µg/g.

A análise enzimática de cepas de *A. fumigatus* de distintas origens foi satisfatória para caracterizar algumas cepas, por exemplo, as cepas de origem clínica animal isoladas de mastite bovina se relacionaram com a variável produção de caseinase. Foi possível verificar também que algumas variáveis consideradas nesse estudo podem ser excluídas em estudos posteriores já que foram indiferentes na caracterização das cepas de distintas origens.

O uso de uma análise multivariada como a Análise em Componentes Principais expressada em gráficos Biplot foi útil, uma vez que pôde dentre as 17 variáveis avaliar aquelas que melhor se relacionaram de acordo com as diferentes origens, por exemplo, a variável produção de gliotoxina melhor caracteriza cepas de origem clínica humana.

A técnica de PCR-RFLP do gene *benA* com as enzimas de restrição *BccI*, *MspI*, *HinfI*, *Sau3A* foi útil para confirmar que todas as cepas previamente identificadas morfológicamente pertencem a espécie *Aspergillus fumigatus stricto sensu*, e para diferenciar outras duas espécies da seção *Fumigati* muito próximas entre si morfológicamente.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

É de suma importância a continuação da caracterização genética de cepas de *Aspergillus fumigatus* e a pesquisa por técnicas moleculares que também possam ser aplicadas na detecção dos genes relacionados à produção de gliotoxina.

Também seria de grande valia a execução de experimentos *in vivo* que pudessem correlacionar a patogenicidade de cepas de *A. fumigatus* potenciais produtoras de gliotoxina, assim como a identificação e caracterização dos fatores de virulência dessas cepas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABAD, A.; FERNÁNDEZ-MOLINA, J. V.; BIKANDI, J.; RAMÍREZ, A.; MARGARETO, J.; SENDINO, J.; HERNANDO, F. L.; PONTÓN, J.; GARAIZAR, J.; REMENTERIA, A. What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 27, n. 4, P. 155-182, 2010.
- ABDIN, M. Z.; AHMAD, M. M.; JAVED, S. Advances in molecular detection of *Aspergillus*: an update. *Archives of Microbiology*, v. 192, n. , p.409–425, 2010.
- AGBLERVOR, F.A.; WEBER J. Microbubble fermentation of *Trichoderma reesei* for cellulase production. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 2, p. 669-679, 2004.
- ARAUJO, R.; PINA-VAZ, C.; RODRIGUES, A. G.; AMORIM, A.; GUSMÃO, L. Simple and highly discriminatory microsatellite-based multiplex PCR for *Aspergillus fumigatus* strain typing. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 15, n. 3, p. 260–266, 2009.
- ARNHEIM, N.; ERLICH, H. Polymerase chain reaction strategy. *Annual Review of Biochemistry*, v. 61, n. , p. 131–156, 1992.
- AUFAUVRE-BROWN, A.; COHEN, J.; HOLDEN, D. W. Use of Randomly Amplified Polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n. 11, p. 2991-3, 1992.
- ALVAREZ-PEREZ, S.; GARCIA, M.E.; BOUZA, E.; PALAEZ, T.; BLANCO, J.L. Characterization of multiple isolates of *Aspergillus fumigatus* from patients: genotype, mating type and invasiveness. *Medical Mycology*, v. 47, n6, 2009.
- BALAJEE, S. A.; GRIBSKOV, J. L.; HANLEY, E.; NICKLE, D.; MARR, K. A. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, v. 4, n. 3, p. 625–632, 2005.
- BALAJEE, S. A.; NICKLE, D.; VARGA, J.; MARR, K. A. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryotic Cell*, v. 5, n. 10, p.1705–1712, 2006.
- BANSOD, S.; GUPTA, I.; RAI, M. Specific detection of *Aspergillus fumigatus* in sputum sample of pulmonary tuberculosis patients by two-step PCR. *African Journal of Biotechnology*, v. 7, n. 1, p. 16–21, 2008.
- BAUER, J.; GAREIS, M.; GOTT, A.; GEDEK, B. Isolation of a mycotoxin (gliotoxin) from a bovine udder infected with *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 27, n. , p. 45-50, 1989.
- BAYER, E.A.; LAMED, R. The cellulose paradox: pollutant par excellence and/or a reclaimable natural resource? *Biodegradation*, v. 3, n. 2-3, p.171-188, 1992.
- BELKACEMI, L.; BARTON, R. C.; HOPWOOD, V.; EVANS, E. G. Determination of optimum growth conditions for gliotoxin production by *Aspergillus fumigatus* and development of a novel method for gliotoxin detection. *Medical Mycology*, v. 37, n. 4, p. 227-33, 1999.
- BIRCH, M.; NOLARD, N.; SHANKLAND, G. S.; DENNING, D. W. DNA typing of epidemiologically-related isolates of *Aspergillus fumigatus*, *Epidemiology and Infection*, v. 114, n. 01, p. 161-8, 1995.
- BIRCH, M.; ANDERSON, M. J.; DENNING, D. W. Molecular typing of *Aspergillus* species, *Journal of Hospital Infection*, v. 30, suplemento, p. 339-51, 1995.

- BOK, J. W.; BALAJEE, S. A.; MARR, K. A.; ANDES, D.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; KELLER, N. P. LaeA, a regulator of morphological fungal virulence factors. *Eukaryotic Cell*, v. 4, n. 9, p. 1574-1582, 2005.
- BOK, J. W.; CHUNG, D.; BALAJEE, S. A.; MARR, K. A.; ANDES, D.; NIELSEN, K. F.; FRISVAD, J. C.; KIRBY, K. A.; KELLER, N. P. GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis contributes to *Aspergillus fumigatus* virulence. *Infection and Immunity*; v. 74, n. 12, p. 6761-6768, 2006.
- BOUDRA, H.; MORGAVI, D.P. Mycotoxin risk evaluation in feeds contaminated by *Aspergillus fumigatus*. *Animal Feed Science and Technology*, v. 120, n. 1-2, p. 113-123, 2005.
- BRUCHMANN, E. Bioquímica técnica. Zaragoza: Editorial Acribia, 233 p., 1980.
- BRUHLMANN, F.; LEUPIN, M.; ERISMANN, K.H.; FIECHTER, A. Enzymatic egumming of ramie bast fibers. *Journal of Biotechnology*, v. 76, n. 1, p. 43-50, 2000.
- CAIRNS, T.; MINUZZI, F.; BIGNELL, E. The host-infecting fungal transcriptome. *FEMS Microbiology Letters*, v. 307, n. 1, p. 1-11, 2010.
- CARDENAS, F.; ALVAREZ, E.; CASTRO-ALVAREZ, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; SINISTERRA, J.V. Screening and catalytic activity in organic synthesis of novel fungal and yeast lipases. *Journal of Molecular Catalyses B: Enzymatic*, v. 14, n. 4-6, p. 111-123, 2001a.
- CARDENAS, F.; CASTRO, M.S.; SANCHEZ-MONTERO, J.M.; SINISTERRA, J.V.; VALMASEDA, M.; ELSON, S.W.; ALVAREZ, E. Novel microbial lipases: catalytic activity in reactions in organic media. *Enzymes and Microbial Technology*, v. 28, n. 2-3, p. 145-154, 2001b.
- CHANTEPERDRIX, V.; BOURGERETTE, E.; GANTIER, J-C.; FAVERGES, G. DE; HERMAN, D.; LAUBY, M. Isolement d'un *Aspergillus* section *Fumigati* d'apparence non-unisériée. *Annales de Biologie Clinique*, v. 66, n. 5, p. 581-3, 2008.
- CRAMER, R. A. JR.; GAMCSIK, M. P.; BROOKING, R. M.; NAJVAR, L. K.; KIRKPATRICK, W. R.; PATTERSON, T. F.; BALIBAR, C. J.; GRAYBILL, J. R.; PERFECT, J. R.; ABRAHAM, S. N.; STEINBACH, W. J. Disruption of a Nonribosomal Peptide Synthetase in *Aspergillus fumigatus* Eliminates Gliotoxin Production. *Eukaryotic Cell*, v. 5, n. 6, p. 972-980, 2006.
- COMÉRA, C.; ANDRÉ, K.; LAFFITTE, J.; COLLET, X.; GALTIER, P., MARIDONNEAU-PARINI, I. Gliotoxin from *Aspergillus fumigatus* affects phagocytosis and the organization of the actin cytoskeleton by distinct signalling pathways in human neutrophils. *Microbes and Infection*, v. 9, n. 1, p. 47-54, 2007.
- COURI, S; FARIAS, A. X. Genetic manipulation of *Aspergillus niger* for increased synthesis of pectinolytic enzymes. *Revista de Microbiologia*, v. 26, n. , p. 314-317, 1995.
- CRUZ, L. C. H. *Micologia Veterinária*, Itaguaí: UFRRJ – IMPRENSA UNIVERSITÁRIA, 1985, 201p.
- CRUZ, C.D. Programa Genes: Biometria. Editora UFV. Viçosa (MG). 382p. 2006.
- CRUZ, T. M. L.; COUTO, F. M. M. do; FRANÇA, G. S. de; LARANJEIRA, D.; NEVES, R. P. Atividade da celulase de leveduras isoladas de frutos de meloeiro. In... Anais IX Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, Recife, 2009.

- DEBEAUPUIS, J. P.; SARFATI, J.; CHAZALET, V.; LATGE, J. P. Genetic diversity among clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity*, v. 65, n. 8, p. 3080-3085, 1997.
- DAGENAIS, T. R. T. E KELLER, N. P. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in Invasive Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 22, n. 3, p. 447-465, 2009.
- D'ANTONIO, D.; VIOLANTE, B.; MAZZONI, A.; BONFINI, T.; CAPUANI, M. A.; D'ALOIA, F.; IACONE, A.; SCHIOPPA, F.; ROMANO, F. A nosocomial cluster of *Candida inconspicua* infections in patients with hematological malignancies, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 03, p. 792-5, 1998.
- DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. Determinação de açúcares redutores e totais em alimentos. Comparação entre método colorimétrico e titulométrico. *Ciências Exatas e da Terra, Ciências Agrárias e Engenharias*, v. 8, n. 1, p. 65 - 78, 2002.
- DENNING, D. W. Invasive aspergillosis. *Clinical of Infectious Diseases*, v. 26, n. 4, p. 781-803, 1998.
- EICHNER, R. D. e MÜLLBACHER, A. Fungal toxins are involved in aspergillosis and AIDS. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, v. 62, n. 4, p. 479, 1984.
- EICHNER, R. D.; SALAAMI, A.; WOOD, P. R.; MÜLLBACHER, A. The effect of gliotoxin upon macrophage function. *International Journal of Immunopharmacology*, v. 8, n. 7, p. 789-97, 1986.
- EINSELE, H.; HEBART, H.; ROLLER, G.; LOFFER, J.; ROTHENHOFER, I.; MULLER, C.A.; BOWDEN, R. A.; VAN BURIK, J.; ENGELHARD, D.; KANZ, L.; SCHUMACHER, U. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 6; p.1353–1360, 1997.
- FISCHER, G.; THIBEN, R.; SCHMITZ, C.; DOTT, W. Relevance of microfungi and their secondary metabolites (mycotoxins) for indoor hygiene. *Proc. Healthy Buildings*, v. 1, n. 1, p. 189-194, 2006.
- FRISVAD, J. C. The use of high-performance liquid chromatography and diode array detection in fungal chemotaxonomy based on profiles of secondary metabolites. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v. 99, n. 1, p. 81–95, 1989.
- FOX, B. C.; MOBLEY, H. L. T.; WADE, J. C. The use of a DNA probe for epidemiological studies of candidiasis in immunocompromised hosts, *Journal of Infectious Diseases*, v. 159 n. 03, p. 488-94, 1989.
- FUNGARO, M. H. P. PCR na micologia. *Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento*, ano 3, n. 14, p. 12-16, 2000.
- GABRIEL, K. R. The biplot graphic display of matrices with application to principal component analysis. *Biometrika*, v. 58, n. 3, p. 453-467, 1971.
- GAMA, F. M.; TEIXEIRA, J.A.; MOTA, M. Direct determination of endoglucanase activity on cellulose insolubly fibres. *Biotechnology Techniques*, v. 5, n. 5, p. 377-382, 1991.
- GAMA, F.M; MOTA, M.; BASTOS, M.; DOURADO F. Studies on the properties of celluclast/Eudragit L-100 conjugate. *Journal of Biotechnology*, v. 99, n. 2, p. 121-131. 2002.

- GARDINER, D. M.; HOWLETT, B. J. Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 248, n. , p. 241-248, 2005.
- GOTTFREDSSON, M.; COX, G. M.; PERFECT, J. R. Molecular methods for epidemiological and diagnostic studies of fungal infections. *Pathology*, v. 30, n. 4, p. 405-418, 1998.
- GUARRO, J.; GENE, J.; STCHIGEL, A. M. Developments in fungal Taxonomy. *Clinical Microbiological Review*, v. 12, n. 3, p. 454–500, 1999.
- GUGNANI, H. C. Ecology and taxonomy of pathogenic aspergilli. *Frontiers in Bioscience*, v. 8, suplemento, p. s346–s357, 2003.
- HADEBALL, W. Production of lipase by *Yarrowia lipolítica*. *Acta Biotechnology*, v. 11, p. 159-167, 1991.
- HARGER, C. ; SPRADA, D. ; HIRATSUKA, E. Amilase Fúngica. In: Bioquímica das Fermentações, 56 p., 1982.
- HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. Microbiologia Veterinária, 2nd ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003, 445p.
- HONG, S. B.; GO, S. J.; SHIN, H. D.; FRISVAD, J. C.; SAMSON, R. A. Polyphasic taxonomy of *Aspergillus fumigatus* and related species. *Mycologia*, v. 97, n. 6, p. 1342–1355, 2005.
- HOTELLING, H. Simplified calculation of principal components. *Psychometrika*, v. 1, n. 1, p. 27-35, 1936.
- JAEGER, K. E; EGGERT, T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, p. 390-397, 2002.
- JAEGER, K. E.; REETZ, M. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. *Tibtech*, v.16, p. 396-403, 1998.
- KATZ, M. E.; DOUGALL, A. M.; WEEKS, K.; AND CHEETHAM, B. F. Multiple genetically distinct groups revealed among clinical isolates identified as atypical *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 2, p. 551–555, 2005.
- KHOUFACHE, K; PEUL, O; LOISEAU, N; DELAFORGE, M.; RIVOLLET, D.; COSTE, A.; CORDONNIER, C.; ESCUDIER, E.; BOTTEREL, F.; BRETAGNE, S. Verruculogen associated with *Aspergillus fumigatus* hyphae and conidia modifies the electrophysical properties of human nasal epithelial cells. *BMC Microbiology*, v. 7, Art. 5, 2007.
- KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S. Mycotoxigenicity of clinical and environmental *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* isolates. *Acta Pharmacologica*, v. 55, n. 4, p. 365-375, 2005.
- KOTHARY, M. H.; CHASE, T. JR.; MACMILLAN, J. D. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infection and Immunity*, v. 43, n. 1, p. 320-325, 1984.
- KRIKŠTAPONIS, A.; LUGAUSKAS, A.; KRYSIŃSKA-TRACZYK, E.; PRAŽMO, Z.; DUTKIEWICZ, J. Enzymatic activities of *aspergillus fumigatus* strains isolated from the air at waste landfills. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v. 8, p. 227–234, 2001.
- KUPFAHL, C.; MICHALKA, A.; LASS-FLORL, C.; FISCHER, G.; HAASE, G.; RUPPERT, T.; GEGINAT, G.; HOF, H. Gliotoxin production by clinical and environmental

Aspergillus fumigatus strains. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 298, n. 3-4, p. 319-327, 2008.

KUPFAHL, C.; HEINEKAMP, T.; GEGINAT, G.; RUPPERT, T.; HARTL, A.; HOF, H.; BRAKHAGE, A. A. Deletion of the gliP gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model. *Molecular Microbiology*, v. 62, n. 1, p. 292-302, 2006.

KWON-CHUNG, K. J.; SURGUI, J. A. What do we know about the role of gliotoxin in the pathobiology of *Aspergillus fumigatus*? *Medical Mycology*, v. 47, suplemento 1, p. S97-103, 2009.

LAIDLER, K.J. Introduction to the Chemistry of Enzymes. New York: McGraw-Hill Book Company Inc., 208 p., 1954.

LARSEN, T. O.; SMEDSGAARD, J.; NIELSEN, K. F.; HANSEN, M. A. E.; SAMSON, R. A.; FRISVAD, J. C. Production of mycotoxins by *Aspergillus lentulus* and other medically important and closely related species in section *Fumigati*. *Medical Mycology*; v. 45, n. 3, p. 225-232, 2007.

LATGE, J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical Microbiological Review*, v. 12, n. 2, p. 310–350, 1999.

LEADLAY, P.F. An Introduction to Enzyme Chemistry. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 82p., 1993.

LEENDERS, A.; BELKUM, A. V.; JANSSEN, S.; MARIE, S. de; KLUYTMANS, J.; WIELENGA, J.; LOWENBERG, B.; VERBRUGHLEEDERS, H. Molecular epidemiology of apparent outbreak of invasive aspergillosis in a hematology ward, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 34, n. 2, p. 345-51, 1996.

LEHMANN, P. F.; LIN, D.; LASKER, B. A. Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using Random Amplified Polymorphic DNA, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 30, n12, p. 3249-3254, 1992.

LESLIE, C.E.; FLANNIGAN, B.; MILNE, L.J.R. Morphological studies on clinical isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Medical Mycology*, v. 26, n. 6, p. 335-341, 1988.

LEWIS, R. E.; WIEDERHOLD, N. P.; CHI, J.; HAN, X. Y.; KOMANDURI, K. V.; KONTTOYIANNIS, D. P.; PRINCE, R. A. Detection of gliotoxin in experimental and human aspergillosis. *Infection and Immunity*, v. 73, n. 1, p. 635-637, 2005a.

LEWIS, R. E.; WIEDERHOLD, N. P.; LIONAKIS, M. S.; PRINCE, R. A.; KONTTOYIANNIS, D. P. Frequency and species distribution of gliotoxinproducing *Aspergillus* isolates recovered from patients at a tertiary-care cancer center. *Journal of Clinical Microbiology* 43, n. 12, p. 6120–6122, 2005b.

LIN, D.; LEHMANN, P. F.; HAMORY, B. H.; PADHYE, A. A.; DURRY, E.; PINNER, R. W.; LASKER, B. A. Comparison of three typing methods for clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus*, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 6, p. 1596-1601, 1995.

LITWACK, G. Bioquímica Experimental: um manual de laboratório. Barcelona: Espanha, p. 23-30, 1967.

LYNCH, J.M., SLATER, J.H., BENNETT, J.A. & HARPER, S.H.T. Cellulase activities of some aerobic microorganisms isolated from soil. *Journal of General Microbiology*, v. 127, n. 2, p. 231-236, 1981.

- MACEDO, G. A.; PASTORE, G. M. Lipases microbianas na produção microbiana de ésteres formadores de aroma. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 17, n. , p. 115-119, 1997.
- MANONMANI, H. K.; ANAND, S.; CHANDRASHEKAR, A.; RATI, E. R. Detection of aflatoxigenic fungi in selected food commodities by PCR. *Process Biochemistry*, v. 40, n. 8, p. 2859-64, 2005.
- MARTÍNEZ, J. V. Fitogeografía de los taxones silvestres de Phaseolus en México y Guatemala. Tese. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México. 226 p. 1995.
- McALPIN, C. E. e MANNARELLI, B. Construction and characterization of a DNA probe for distinguishing strains of *Aspergillus flavus*, *Applied and Environmental Microbiology*, v. 61, n. 3, 1995.
- McCULLOUGH, M. J.; CLEMONS, K. V.; FARINA, C.; McCUSKER, J. H.; STEVENS, D. A. Epidemiological investigation of vaginal *Saccharomyces cerevisiae* isolates by a genotypic method, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 02, p. 557-62, 1998.
- McNEIL, M. M., NASH, S. L.; HAJJEH, R. A.; PHELAN, M. A.; CONN, L. A.; PLIKAYTIS, B. D.; WARNOCK, D. W. Trends in mortality due to invasive mycotic diseases in the United States, 1980–1997. *Clinical of Infectious Diseases*, v. 33, n. 5, p. 641- 647, 2001.
- MITCHELL, T. G.; SANDIN, R. L.; BOWMAN, B. H.; MEYER, W.; MERZ, W. G. Molecular mycology: DNA probes and applications of PCR technology, *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, v. 32, suppl. 1, p. 351-66, 1994.
- MOLINA, S. M. G.; PELISSARI, F.; VITORELLO, C. B. M. Screening and genetic improvement of pectinolytic fungi for degumming of textile fibers. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 32, n. 4, p. 320-326, 2001.
- MOLINA, L.; TOLDRA, F. Detection of proteolytic activity in microorganisms isolated from dry cured ham. *Journal of Food Science*, v.57, n. 6, p.1308-1310, 1992.
- MORGAN, J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARR, K. A.; HADLEY, S.; KONTOYIANNIS, D. P.; WALSH, T. J.; FRIDKIN, S. K.; PAPPAS, P. G.; WARNOCK, D. W. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicenter surveillance program. *Medical Mycology*, v. 43, sup. 1, p. S49-S58, 2005.
- MÜLLBACHER, A.; MORELAND, A. F.; WARING, P.; SJAARDA, A.; EICHNER, R. D. Prevention of graft versus host disease by treatment of bone marrow with gliotoxin in fully allogeneic chimeras and their cytotoxic T cell repertoire. *Transplantation*, v. 46, n. 1, p. 120-25, 1988.
- MÜLLBACHER, A.; WARING, P.; EICHNER, R. D. Identification of an agent in cultures of *Aspergillus fumigatus* displaying antiphagocytic and immunomodulating activity *in vitro*. *Journal of General Microbiology*, v. 131, n. 5, p. 125 1-58, 1985.
- NIEMINEN, S. M.; MÄKI-PAAKKANEN, J.; HIRVONEN, M. R.; ROPONEN, M.; WRIGHT, A. von. Genotoxicity of gliotoxin, a secondary metabolite of *Aspergillus fumigatus*, in a battery of short-term test systems *Mutation Research*, v. 520, n. 1-2, p. 161–170, 2002.
- OLIVEIRA, D.T.M. *Lipase extracelular de fungo filamentoso: Isolamento e caracterização parciais*. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 2000. 152 p. (Dissertação, Mestrado em Ciências de Alimentos).

- PANDEY, A.; WEBB, C.; SOCCOL, C.R.; LARROCHE, C. Enzyme Technology. 1ª ed. New Delhi: Asiatech Publishers, Inc, 760 p., 2005.
- PANNUTI, C.; GINGRICH, R.; PFALLER, M. A.; KAO, C.; WENZEL, R. P. Nosocomial pneumonia in patients having bone marrow transplant, *Cancer*, v. 69, n. 1, p. 2653-62, 1992.
- PARKER GF, JENNER PC. Distribution of trypacidin in cultures of *Aspergillus fumigatus*. *Applied Microbiology*; v. 16, n. 8, p. 1251-1252, 1968.
- PENA, G.A.; PEREYRA, C.M.; ARMANDO, M.R.; CHIACCHIERA, S.M.; MAGNOLI, C.E.; ORLANDO, J. L.; DALCERO, A.M.; ROSA, C.A.R.; CAVAGLIERI, L.R. *Aspergillus fumigatus* toxicity and gliotoxin levels in feedstuff for domestic animals and pets in Argentina. *Letters in Applied Microbiology*, v. 50, n. 1, p. 77-81, 2010.
- PEREYRA, C.M.; ALONSO, V.A.; ROSA, C.A.R.; CHIACCHIERA, S.M.; DALCERO, A.M.; CAVAGLIERI, L.R. Gliotoxin natural incidence of *Aspergillus fumigatus* isolated from corn silage and ready dairy cattle feed. *World Mycotoxin Journal*, v. 1, n. 4, 457-462, 2008.
- QUAGLIA, G. *Ciência y Tecnología de la Panificación*. Zaragoza: Editorial Acribia, 485 p., 1991.
- RAMOS, C. M.; MARTÍNEZ, S. E. V.; OLIVARES, R. A. C. Gliotoxin production in 10 strains of *Aspergillus fumigatus* isolated from clinical cases. *Revista Mexicana de Ciências Pecuárias*, v. 40, n. 2, p. 139-148, 2002.
- RATH, P.-M. Phenotypic and genotypic characterization of reference strains of the genus *Aspergillus*. *Mycoses*, v. 44, n. 3-4, p. 65-72, 2001.
- RATH, P. M.; MARGGRAF, G.; DERMOUMI, H.; ANSORG, R. Use of phenotypic and genotypic fingerprinting methods in the strain identification of *Aspergillus fumigatus*, *Mycoses*, v. 38, n. 11-12, p. 429-34, 1995.
- REAGAN, D. R.; PFALLER, M. A.; HOLLIS, R. J.; WENZEL, R. P. Characterization of the sequence of colonization and nosocomial candidemia using DNA fingerprinting and a DNA probe, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 28, n. 12, p. 2733-2738, 1990.
- REED, G. *Enzymes in food processing*. 2. ed. Wisconsin: Academic Press, 573 p., 1975.
- REEVES, E. P.; MESSINA, C. G. M.; DOYLE, S.; KAVANAGH, K. Correlation between gliotoxin production and virulence of *Aspergillus fumigatus* in *Galleria mellonella*. *Mycopathologia*, v. 158, n. , p. 73-79, 2004.
- RICHARD, J.; DVORAK, T. J.; ROSS, P. F. Natural occurrence of gliotoxin in turkeys infected with *Aspergillus fumigatus*, Fresenius. *Mycopathologia*, v. 134, n 3, p. 167-170, 1996.
- RINYU, E.; VARGA, J.; FERENCZY, L. Phenotypic and genotypic analysis of variability in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 10, p. 2567-2575, 1995.
- ROBSON, L.M.; CHAMBLISS, G.H. Cellulases of bacterial origin. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 11, n. 10, p. 626-644, 1989.
- RODRIGUES, A. N.; SANT'ANNA, E. S. Efeito do cloreto de sódio na produção de proteínas (*Saccharomyces cerevisiae*) em fermentação semi-sólida. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 21, n. 1, p. 63-66, 2001.

- RUEGGER, M. J. S.; TAUKE-TORNISIELO, S. M. Atividade da celulase de fungos isolados do solo da Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 27, n. 2, p. 205-211, 2004.
- SANDHU, G. S.; KLINE, B.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G. D. Molecular probes for diagnosis of fungal infections. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 33, n. 11; p. 2913–2919, 1995.
- SANDOVAL, G.; MARTY, A. Screening methods for synthetic activity of lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 3, p. 390-393, 2007.
- SANTOS, V. M. dos.; DORNER, J. W.; CARREIRA, F. Isolation and toxigenicity of *Aspergillus fumigatus* from moldy silage. *Mycopathologia*, v. 156, n. 2, p. 133 - 138, 2003.
- SCHAEFER, R. Técnicas em biologia molecular. Concórdia-SC, EMBRAPA Suínos e aves, 24p, 2006.
- SCHMIDT, A.; WOLFF, M. H. Morphological characteristics of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from patient samples. *Mycoses*, v. 40, n. 9-10, p. 347-351, 1997.
- SELVAKUMAR, P.; ASHAKUMARY, L.; HELEN, A.; PANDEY, A. Purification and characterization of glucoamylase produced by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. *Letters in Applied Microbiology*, v. 23, n. 6, p.403-406, 1996.
- SILVA, E.G.; BORGES, M.F.; MEDINA, C.; PICCOLI, R.H.; SCHWAN, R.F. Pectinolytic enzymes secreted by yeasts from tropical fruits. *FEMS Yeast Research*, v. 5, n. 9, p. 859-865. 2005.
- SOCCOL, C. R. ROJAN, P. J.; PATEL, A. K.; WOICIECHOWSKI, A. L.; VANDENBERGHE, L.P.S.; PANDEY, A. Glucoamylase. In: Enzyme Technology. New Delhi: Asiatec Publishers Inc., p. 221-230, 2005.
- SPIER, M. R. ; WOICIECHOWSKI, A. L. ; SOCCOL, C. R. Produção de α -Amilase por *Aspergillus* em Fermentação no Estado Sólido de Amido de Mandioca e Bagaço de Cana-de-Açúcar. VI SEMINÁRIO BRASILEIRO DE TECNOLOGIA ENZIMÁTICA. Anais Enzitec 2004. Rio de Janeiro: Enzitec, 2004. v. 1. p. 116-116.
- SPIKES, S., XU, R.; NGUYEN, C. K.; CHAMILOS, G.; KONTOYIANNIS, D. P.; JACOBSON, R. H.; EJZYKOWICZ, D. E.; CHIANG, L. Y.; FILLER, S. G.; MAY, G. S. Gliotoxin production in *Aspergillus fumigatus* contributes to host-specific differences in virulence. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 197, n. 3, p. 479-486, 2008.
- STAAB, J. F.; BALAJEE, S. A.; MARR, K. A. *Aspergillus* section *Fumigati* typing by PCR-Restriction Fragment Polymorphism, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 47, n. 7, p. 2079-2083, 2009.
- STANZANI, M.; ORCIUOLO, E.; LEWIS, R.; KONTOYIANNIS, D. P.; MARTINS, S. L. R.; JOHN, L. S. ST.; KOMANDURI, K. V. *Aspergillus fumigatus* suppresses the human cellular immune response via gliotoxin-mediated apoptosis of monocytes. *Blood*, v. 105, n. 6, p. 2258-2265, 2005.
- SUGUI, J. A.; PARDO, J.; CHANG, Y. C.; ZAREMBER, K. A.; NARDONE, G.; GALVEZ, E. M.; MÜLLBACHER, A.; GALLIN, J. I.; SIMON, M. M.; KWON-CHUNG ; K. J. Gliotoxin is a virulence factor of *Aspergillus fumigatus*: *gliP* deletion attenuates virulence in mice immunosuppressed with hydrocortisone. *Eukaryotic Cell*, v. 6, n. 9, p. 1562–1569, 2007.
- SULYOK, M.; BERTHILLER, F.; KRŠKA, R.; SCHUHMACHER, R. Development and validation of a liquid chromatography/tandem mass spectrometric method for the

- determination of 39 mycotoxins in wheat and maize. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 20, n. 18, p. 2649-2659, 2006.
- SUTTON, P.; WARING, P.; MÜLLBACHER, A. Exacerbation of invasive aspergillosis by the immunosuppressive fungal metabolite, gliotoxin. *Immunology and Cell Biology*, v. 74, n. 4, p. 318-322, 1996.
- SUTTON, P.; NEWCOMBE, N. R.; WARING, P.; MÜLLBACHER, A. *In vivo* immunosuppressive activity of gliotoxin, a metabolite produced by human pathogenic fungi. *Infection and Immunity*; v. 62, n. 4, p. 1192-98, 1994.
- SZAKACS, G. Production of Industrial Enzymes in Solid-State Fermentation. In: Anais International Congress on Bioprocess in Food Industries, Clermont-Ferrand, France. v. 1, p. 20, 2004.
- TÉREN, J., VARGA, J., HAMARI, Z., RINYU, E. AND KEVEI, F. Immunochemical detection of ochratoxin A in black *Aspergillus* strains. *Mycopathologia*, v. 134, n. 3, 171-176, 1996.
- VALK, H. A. de; KLAASSEN, C. H. W.; MEIS, J. F. G. M. Molecular typing of *Aspergillus* species. *Mycoses*, v. 51, n. 6, p.463–476, 2008.
- VAZQUEZ, J. A.; DEMBRY, L. M.; SANCHEZ, V.; VAZQUEZ, M. A.; SOBEL, J. D.; DMUCHOWSKI, C.; ZERVOS, M. J. Nosocomial *Candida glabrata* colonization: an epidemiologic study, *Journal of Clinical Microbiology*, v. 36, n. 02, p. 421-6, 1998.
- WAINWRIGHT, M. Introducción a la Biotecnología de los Hongos. Zaragoza: Acribia, 228 p., 1995.
- WARD, O. Biotecnología de La Fermentación: Principios, Procesos e Productos. Zaragoza: Editorial Acribia S.A., p. 64-67 e 233-247, 1989.
- WALTER, E. A.; BOWDEN, R. A. Infection in the bone marrow transplant recipient. *Infectious Disease Clinics of North America*, v. 9, n. 4, p. 823-47, 1995.
- WARING, P.; KOS, F. J.; MÜLLBACHER, A. Apoptosis or programmed cell death, *Medicinal Research Reviews*, v. 11, n. 2, p. 219–236, 1991.
- WATANABE, A; KAMEI, K.;SEKINE, T.; WAKU, M.; NISHIMURA, K.; MIYAJI, M.; TATSUMI, K.; KURIYAMA, T. Effect of aeration on gliotoxin production by *Aspergillus fumigatus* in its culture filtrate. *Mycopathologia*, v. 157, n. 1, p. 245-254, 2004.
- WELSH, J.; MCCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acids Research*, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.
- WILD, C. P. Aflatoxin exposure in developing countries: the critical interface of agriculture and health. *Food & Nutrition Bulletin*, v. 28, sup. 2, p. S372–S380, 2007.
- WILLGER, S.; GRAHL, N.; CRAMER, R. JR. *Aspergillus fumigatus* metabolism: Clues to mechanisms of in vivo fungal growth and virulence. *Medical Mycology*, v. 47, suplemento 1, S72-S79, 2009.
- WILLGER, S. D.; PUTTIKAMONKUL, S.; KIM, K. H.; BURRITT, J. B.; GRAHL, N.; METZLER, L. J.; BARBUCH, R.; BARD, M.; LAWRENCE, C. B.; CRAMER, R. A. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathogens*, v. 4, n.11, p. 1-18, 2008.

WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI, J. A.; TINGEY, S. V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Research*, v. 18, n. 22, p. 6531-6535, 1990.

WILLIAMS, J. H.; PHILLIPS, T. D.; JOLLY, P. E.; STILES, J. K.; JOLLY, C. M.; AGGARWAL, D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 80, n. 5, p. 1106-1122, 2004.

YAMADA, A.; KATAOKA, T.; NAGAI, K. The fungal metabolite gliotoxin: immunosuppressive activity on CTL-mediated cytotoxicity. *Immunology Letters*, v. 71, n. 1, p. 27-32, 2000.

ZHAO, J.; KONG, F.; LI, R.; WANG, X.; WAN, Z.; WANG, D. Identification of *Aspergillus fumigatus* and related species by nested PCR targeting ribosomal DNA internal transcribed spacer regions. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, n. 6, p. 2261–2266, 2001.